

VANETE THOMAZ

**MECANISMOS DE REGULAÇÃO DOS NÍVEIS DA L-LACTATO DESIDROGENASE  
PIRIDINO NUCLEOTÍDEO INDEPENDENTE DE *Dactylium dendroides***

Tese apresentada ao Departamento de  
Bioquímica do Setor de Ciências Bioló-  
gicas da Universidade Federal do Para-  
ná para obtenção do Grau de Mestre.

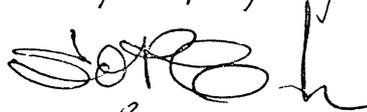
CURITIBA

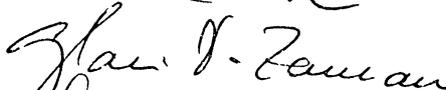
1981

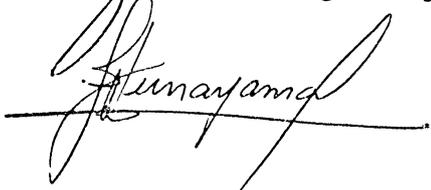
Tese orientada pelo  
Prof. SHIGEHIRO FUNAYAMA

Comissão Examinadora

 - Dr. José Carlos da Costa Maia

 - Dr. Sergio Olavo Pinto da Costa

 - Dra. Glaci T. Zancan

 - Dr. Shigehiro Funayama

Ao meu esposo e minha filha  
com amor.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	i
ABREVIATURAS UTILIZADAS .....	ii
1 - INTRODUÇÃO .....	08
2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	12
2.1 - MATERIAIS .....	12
2.1.1 - Aparelhos .....	12
2.1.2 - Produtos químicos .....	12
2.1.3 - Microorganismo .....	13
2.1.4 - Meios de cultura .....	13
2.2 - MÉTODOS .....	14
2.2.1 - Conservação das cepas .....	14
2.2.2 - Pré inóculo .....	14
2.2.3 - Curva de crescimento .....	14
2.2.4 - Preparo da suspensão de micélios em repouso..	15
2.2.5 - Preparo de extrato livre de células ....	15
2.2.6 - Determinação da atividade enzimática ...	15
2.2.7 - Unidade de enzima e atividade específica	16
2.2.8 - Dosagem de proteína .....	16
3 - RESULTADOS .....	17
3.1 - Curva de crescimento .....	17
3.2 - Níveis da L-lactato desidrogenase piridino nu- cleotídeo independente em células de <i>Dactylium</i> <i>dendroides</i> crescidas na presença de diferentes fontes de carbono .....	17
3.3 - Efeito da glucose, glicerol, etanol e piruvato sobre a razão de indução em células de <i>Dactylium</i> <i>dendroides</i> em repouso.....	17
3.4 - Determinação da velocidade diferencial de síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotí- deo independente em células de <i>Dactylium dendroi-</i> <i>des</i> em crescimento na presença de lactato .....	18
3.5 - Indução da síntese da L-lactato desidrogenase pi- ridino nucleotídeo independente em células de <i>Dactylium dendroides</i> em repouso por lactato.....	18

3.6 - Efeito do etanol, glicerol, glucose e piruvato sobre a indução da síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente por lactato em células de <i>Dactylium dendroides</i> em repouso.....	18
3.7 - Efeito da cicloheximida sobre a indução da síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente, induzido por lactato em células de <i>Dactylium dendroides</i> em repouso .....	19
3.8 - Efeito da glucose sobre a L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente induzida em células de <i>Dactylium dendroides</i> em crescimento na presença de lactato.....	19
3.9 - Efeito da concentração de glucose sobre a L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente induzida por lactato em células de <i>Dactylium dendroides</i> em repouso .....	20
3.10 - Efeito da adição simultânea da glucose e cicloheximida sobre a atividade de L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente induzida por lactato em células de <i>Dactylium dendroides</i> em repouso .....	20
3.11 - Efeito sequencial da glucose e de cicloheximida sobre a atividade da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente induzida por lactato em células de <i>Dactylium dendroides</i> em repouso.....	20
3.12 - Efeito do AMPc sobre a atividade repressora e inibitória estimulada pela glucose durante a indução da síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente por lactato em células de <i>Dactylium dendroides</i> em repouso.....	21
TABELA I .....	22
TABELA II .....	23
TABELA III .....	24

FIGURA 1 .....	25
FIGURA 2 .....	26
FIGURA 3 .....	27
FIGURA 4 .....	28
FIGURA 5 .....	29
FIGURA 6 .....	30
FIGURA 7 .....	31
FIGURA 8 .....	32
FIGURA 9 .....	33
FIGURA 10 .....	34
FIGURA 11 .....	35
FIGURA 12 .....	36
FIGURA 13 .....	37
FIGURA 14 .....	38
4 - DISCUSSÃO .....	39
5 - CONCLUSÕES .....	47
6 - AGRADECIMENTOS .....	48
7 - BIBLIOGRAFIA .....	49

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

AMPc = Adenosina monofosfato cíclico

D.C.I.P. = 2,6-diclorofenol indofenol

DNA = Ácido desoxeribonucleico

LDHPNI = Lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente

M.M. = Meio mínimo mineral

mRNA = Ácido ribonucleico mensageiro

mU = miliunidade

## RESUMO

A síntese de uma L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente foi induzida em células de *Dactylium dendroides* em crescimento e em repouso por lactato de sódio.

Fontes de carbono tal como etanol, glicerol e piruvato são ineficazes como indutor.

Experimentos de indução realizados na presença de cicloheximida indicam que a indução da síntese da LDHPNI é dependente da síntese proteica.

A adição de glucose a uma cultura de *Dactylium dendroides* em repouso, cuja síntese da enzima fora previamente efetivada na presença de lactato, provoca uma brusca queda da atividade específica.

A inativação da LDHPNI estimulada pela adição de glucose ao cultivo é evitada e ou revertida pela presença de cicloheximida ou de AMPc.

Os resultados sugerem que esta enzima é inativada por um fator proteico inativante que é sintetizado na presença de glucose.

## 1 - INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

As enzimas que estão sempre presentes em concentrações aproximadamente constantes em determinado organismo, são denominadas enzimas constitutivas. Os gens codificados para síntese dessas enzimas estão portanto sempre derreprimidos. Existem por outro lado, as enzimas adaptativas ou induzíveis, que são sintetizadas pela célula somente em resposta a presença de certos substratos. Extensa investigação sobre regulação das enzimas do operon da lactose em organismos procarióticos resultou na maioria dos conceitos básicos de biologia molecular. A elucidação e verificação dos conceitos de JACOB e MONOD (31) tem influenciado a respeito da regulação de células superiores (5). Contudo, como notou TOMKINS et al. (70), muitas das estruturas e função da organização celular e genética de células eucarióticas são diferentes.

As células eucarióticas tem, na realidade, capacidade de biossintetizar algumas enzimas quando em presença do indutor adequado. A resposta das células eucarióticas a agentes indutores tende a ser relativamente lenta e menos drástica que em células procarióticas. Os gens requeridos para síntese de enzimas induzíveis parecem estar dispersos entre vários cromossomos nas células eucarióticas e em geral, estão reprimidos, mas poderão desempenhar seu papel biossintético se derreprimidos adequadamente (54).

A indução será portanto, interpretada como o aumento na atividade específica de determinada enzima causada pela "síntese de novo" que se faz operante na presença do agente indutor.

Em 1898, KATZ e WISS (36) trabalhando com a amilase de *Penicillium*, verificaram que a indução dessa enzima era reduzida pela adição de glucose ao meio de cultivo. Dois anos mais tarde, DIENERT (9) observou um efeito similar durante a indução da galactozimase de leveduras. Essa redução na capacidade de indução enzimática causada pela glucose, conhecida na época como "efeito da glucose", foi motivo de inúmeros trabalhos de pesquisa com intuito de esclarecer o problema (3,19,43). Entretanto, somente em 1942, graças do trabalho de EPPS e GALE (12) que o efeito da glucose passou a ser encarado como um

fenômeno à parte que efetivamente participava na regulação do metabolismo de carboidratos. Até então, acreditava-se que o efeito observado era um resultado acidental, isto é, acarretado pela produção de ácidos durante a fermentação. Nos anos subsequentes, inúmeros trabalhos referidos por PAIGEN e WILLIAMS (54) descrevem alguns aspectos básicos de efeito da glucose e MAGASANIK (38) propõe a esse efeito a denominação de "repressão catabólica", visto que, não necessariamente a glucose, mas sim seus catabólitos derivados é que desencadeiam o processo de repressão. A repressão catabólica será portanto, interpretada como a redução na velocidade da síntese de certas enzimas, principalmente aquelas envolvidas nos processos catabólicos, na presença de glucose ou de outra fonte de carbono imediatamente metabolizável. Esse efeito sobre a velocidade de síntese é duradouro enquanto a concentração do agente repressor for suficientemente elevada para sustentar a repressão. Entretanto, quando nas condições anteriormente citadas, o período de duração do fenômeno for igual ou inferior a um tempo de geração, a repressão passa ser denominada "repressão transitória" (54). A repressão transitória foi verificada com  $\beta$ -galactosidase de mutantes de *Escherichia coli* por PAIGEN (53) sempre que o glicerol era substituída por glucose MOSES e PŘEVOST (45) trabalhando com diferentes mutantes de *Escherichia coli* verificaram repressão transitória da  $\beta$ -galactosidase sempre que a glucose era adicionada ao cultivo contendo glicerol. Esse tipo de repressão não é limitado à *Escherichia coli*, já que o fenômeno foi também observado com a  $\beta$ -galactosidase de *Salmonella typhimurium* (70), com a amidase de *Pseudomonas aeruginosa* 8602 (7) e com a galactoquinase de *Saccharomyces cerevisiae* (1).

Com relação ao nível de controle desses tipos de repressão, os resultados são conflitantes. NAKADA e MAGASANIK (46,47) e KEPES (37) verificaram que o controle da repressão da  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* se processava ao nível de transcrição do DNA em mRNA. Por outro lado, WIJK et al. (76) verificou que o controle da repressão da  $\alpha$ -glucosidase de *Saccharomyces carlsbergensis* processava-se ao nível da tradução do mRNA em proteínas. TOMÁS et al. (69)

observaram que em *Penicillium italicum* o efeito de repressão da glucose sobre a  $\beta$ -1,3-glucanase poderia ser exercido a um nível pretraducional durante a biossíntese do mRNA ou durante algum estágio do processamento que envolve a sua maturação.

A redução imediata da atividade específica de enzimas de determinado organismo por adição de glucose ao cultivo, foi verificado pela primeira vez por WOODS (80) em 1935 com um sistema enzimático de *Escherichia coli* que transforma o triptofano em indol. Esse fenômeno, conhecido na época por "inibição catabólica", motivou inúmeros pesquisadores a trabalharem nesse campo (67). Em 1976, HOLZER (29) empregou o termo "inativação catabólica" para descrever o decréscimo brusco de atividade específica de certas enzimas de leveduras pela adição de glucose ao cultivo. Na revisão de SWITZER (67) em 1977 por exemplo, são citadas cerca de 40 enzimas cujos níveis enzimáticos são controlados por esse fenômeno. O mesmo fenômeno tem sido descrito para a frutose-1.6-difosfatase (20), malato desidrogenase citoplasmática (11,78), fosfoenol piruvato carboxiquinase (21), isopropil-malato sintase (6) e maltose permease (25,59) todas de *Saccharomyces cerevisiae* e ainda para a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Basidiomiceto* QM 806, (15); aspartato transcarbamilase de *Bacillus subtilis* (4), nitrato reductase de *Chlorella* (34), nitrato reductase assimilatória de *Neurospora crassa* (65) lisina descarboxilase de *Bacillus cadaveris* (40) e isocitrato desidrogenase de *Escherichia coli* (2).

HOLZER (29) sugeriu que esse tipo de inativação poderia envolver algum processo proteolítico responsável pela degradação de enzimas. Entretanto, pouco ou quase nada se conhece sobre o mecanismo de inativação catabólica.

HEMMINGS (28) e NEEF et al (48,49) em 1978, FUNAYAMA (16) em 1979 e FUNAYAMA et al (17) em 1980 apresentaram as primeiras evidências da participação de um processo proteolítico durante a inativação catabólica de enzimas.

Em 1974 FUNAYAMA e ZANCAN (18) verificaram que os níveis de lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente e dependente de *Polyporus circinatus* (*Dactylium dendroides*) eram praticamente indetectáveis quando o organismo era crescido em presença de

glucose como fonte de energia e carbono. Entretanto, quando crescido em presença de lactato, elevados níveis de L-lactato desidrogenase piridino nucleotideo independente foram observados sem contudo ocorrerem alterações nos níveis da enzima piridino-nucleotideo dependente.

O presente trabalho teve por objetivo estudar os mecanismos de regulação dos níveis da L-lactato desidrogenase piridino nucleotideo independente de *Dactylium dendroides*.

## 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

## 2.1 - MATERIAIS

### 2.1.1 - APARELHOS

Agitador de tubos Vortex Genie, Modelo - K - 550-G  
Agitador rotatório - New Brunswick  
Aparelho para filtração Millipore XX 00 30 25  
Balança analítica, E. Mettler  
Centrífuga Clínica Sorval,  
Centrífuga refrigerada Beckman, modelo J 21.B  
Espectrofotômetro, Varian Techtron modelo 635-D com re-  
gistrador  
Espectrofotômetro, Beckman D.U.-2 com registrador  
Fotocolorímetro Coleman Jr., modelo 6.A.H.5527.

### 2.1.2 - PRODUTOS QUÍMICOS

Ácido clorídrico, E. Merck  
Ácido lático, E. Merck  
Agar (Bacto-agar), Difco Laboratories  
Albumina bovina, Sigma Chem. Co.  
D-glucose, Ecibra  
Dibutiriladenosina monofosfato cíclico, Sigma Chem. Co.  
2,6-Diclorofenol indofenol, E. Merck  
Etanol, E. Merck  
Fosfato de potássio, E. Merck  
Fosfato de sódio, E. Merck  
Glucose oxidase, Sigma Chem. Co.  
Glicerol, Reagen  
Hepes (Ácido N-2 hidroxietil piperazina N'-2-etano sulfô-  
nico) Sigma Chem. Co.  
Imidazol, Sigma Chem. Co.  
L (+) lactato de sódio, Sigma Chem. Co.  
Ortodianizidina, Sigma Chem. Co.  
Peroxidase, Sigma Chem. Co.  
Piruvato de sódio, E. Merck  
Tris (hidroximetil) amino metano, E. Merck  
As demais substâncias utilizadas neste trabalho eram pro-  
dutos pró-análise.

### 2.1.3 - MICROORGANISMO

A cepa de *Dactylium dendroides*, anteriormente denominada *Polyporus circinatus* foi-nos gentilmente cedida pela Dra. GLACI T. ZANCAN do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

### 2.1.4 - MEIOS DE CULTURA

A composição do meio líquido era semelhante ao proposto por MARKUS et al. (41) e suplementado com 0,5 mg% de cloridrato de tiamina em substituição ao extrato de levedura. O meio descrito a seguir será denominado de meio mínimo mineral de composição definida e designado pela sigla M.M.

O meio de cultura sólido é o meio designado por Ágar Sabouraud.

As fontes de carbono empregadas foram separadamente esterilizadas em vapor fluente e adicionadas asepticamente ao meio mineral em quantidade suficiente para uma concentração final de 1%.

#### Meio Mínimo Mineral de composição definida.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	9,00g
$\text{NaHPO}_4$	8,00g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,00g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20g
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,00g
Tiamina	10,00mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2%	1,00ml
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2%	0,125ml
$\text{H}_2\text{O}$ destilada q.s.p.	1,00 l

O pH final foi corrigido para 5.8 com HCl 1N e autoclavado a 1,5 atm de pressão por 20 minutos.

#### Meio de cultura sólido - Ágar Sabouraud.

Glucose	2,0 g%
Peptona	1,0 g%
Extrato de levedura	0,5 g%
Ágar	1,5 g%

O pH resultante dessa mistura é da ordem de 6,5.

A esterilização desse meio foi realizada por autoclavagem a 1 atm de pressão por 20 minutos.

## 2.2 - MÉTODOS

### 2.2.1 - CONSERVAÇÃO DAS CEPAS

Os fungos foram repicados mensalmente em meio de cultura sólido e após crescimento por 24 horas à temperatura de 28°C, foram mantidos a 4°C.

### 2.2.2 - PRÉ INÓCULO

Micélios do meio sólido foram transferidos para 100 ml de meio M.M. contendo 1% de glucose contidos em erlenmeyer de 250 ml. A cultura foi incubada em agitador rotatório (100 rpm) a 28°C por um período de 24 horas. As culturas assim obtidas constituem o pré inóculo.

### 2.2.3 - CURVA DE CRESCIMENTO

Para as curvas de crescimento, volumes de 600 ml de meio M.M. foram distribuídos em erlenmeyer de 2.000 ml, autoclavados e adicionados posteriormente das fontes de carbono. Estes meios contendo diferentes fontes de carbono foram inoculados com 5 ml do pré-inóculo e incubados em agitador rotatório (100 rpm) a 28°C.

Em diferentes intervalos de tempo, alíquotas de 25 ml de cultivo foram filtradas em discos de papel Wheaton de peso conhecido e adaptados em aparelho de filtração Millipore. Os filtros contendo os micélios foram secados em estufa a 60°C até peso constante. O peso seco dos micélios foi calculado por diferença. O tempo de geração foi calculado de acordo com o método de MONOD (44) e a constante de crescimento segundo a equação de WILLIAMS e NEIDHARDT (77).

#### 2.2.4 - PREPARO DA SUSPENSÃO DE MICÉLIOS EM REPOUSO

Os micélios de *Dactylium dendroides* foram crescidos em meio M.M. a 28°C contendo 1% de glucose. A aeração foi realizada por agitação em agitador rotatório (100 rpm). Os micélios na fase, exponencial de crescimento (36-40 horas de cultivo) foram coletados por filtração em gaze, lavados com água destilada (28°C) e resuspensos no mesmo volume inicial do meio M.M. a 28°C sem fonte de carbono. Essa suspensão de micélios foi, então, jejuada por 15 horas sob agitação constante (100 rpm) à temperatura de 28°C e subdividida em diferentes porções de acordo com o experimento.

#### 2.2.5 - PREPARO DE EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS

Os micélios em crescimento exponencial foram colhidos por filtração como descrito no ítem anterior, lavados com água destilada e utilizados imediatamente para preparação de extratos.

Os extratos foram preparados em tubo pirex Sorvall (15 mm X 100 mm) contendo 200-250 mg em peso úmido de micélios, 3g de glass beads (0,5mm diâmetro) e 1,5 ml de tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,5. A ruptura das células foi realizada por agitação durante cinco minutos, com refrigeração após cada minuto. As agitações foram realizadas em agitador de tubos Vortex Genie a velocidade máxima e as refrigerações em banho de gelo. Os homogeneizados foram transferidos para tubos corex (5mm X 50mm) com auxílio de pipetas Pasteur e centrifugado a 12.000 x g à temperatura de 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados com pipetas Pasteur, transferidos para pequenos tubos e utilizados como fonte de enzima.

#### 2.2.6 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi medida pela redução do 2,6-diclorofenol indofenol na presença de lactato de sódio como substrato (18). A redução do corante foi seguida espectrofotometricamente em 600 nm em um espectrofotometro Varian Techtron mod. 635-D termostabilizado à temperatura de 27°C.

O sistema de incubação, pH 6.7, continha: 80 mM de imidazol-HCl, 72 µM de 2,6-diclorofenol indofenol, 12,5 mM lactato de

sódio e volume adequado de extrato livre de células num volume final de 1 ml. A reação foi iniciada pela adição do extrato.

#### 2.2.7 - UNIDADE DE ENZIMA E ATIVIDADE ESPECÍFICA

Uma unidade da lactato desidrogenase foi definida como a quantidade de enzima que causa a oxidação de 1,0  $\mu\text{mol}$  de L-lactato por minuto nas condições padronizadas neste trabalho.

A atividade específica foi definida como unidades de lactato desidrogenase por mg de proteína.

#### 2.2.8 - DOSAGEM DE PROTEÍNA

As dosagens de proteínas nos extratos livre de células foram realizadas pelo método de LOWRY et al. (35) após precipitação com ácido tricloroacético a 5%, utilizando albumina bovina como padrão.

As dosagens de proteínas em células intactas foram realizadas segundo o método de JAYARAMAN et al. (32). Este método consiste em tratar a suspensão de micélios (3 ml) com 1ml de NaOH 0.6 M a temperatura de 95°C durante 15 minutos. Após esfriamento, essas preparações foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante utilizado para dosagens de proteína de acordo com o método de LOWRY et al. (35) modificado. A modificação introduzida é o emprego da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 2% em água destilada e não NaOH 0.1 M uma vez que as amostras empregadas continham quantidades suficientes de NaOH.

### 3 - RESULTADOS

## RESULTADOS

### 3.1 - Curva de Crescimento

As variações nos tempos de geração, nas constantes de crescimento e o final da fase logarítmica foram determinados quando o fungo utiliza diferentes fontes de carbono. Seu crescimento foi determinado pelo aumento do peso seco em função do tempo. Curvas representativas de crescimento são mostradas nas figuras 1, 2, 3, 4, 5 e na tabela I é dado os tempos de geração e as constantes de crescimento.

A análise destes resultados mostra claramente que os tempos de geração do fungo crescido na presença de diferentes fontes de carbono variaram de 6 a 13 horas e as constantes de crescimento variaram de 0,05 a 0,11 h<sup>-1</sup>. O fato observado indica que a eficiência com que os organismos utilizam diferentes fontes de carbono para sua proliferação obedece a seguinte ordem decrescente: glucose, etanol e glicerol, lactato e piruvato.

### 3.2 - Níveis da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente em células de *Dactylium dendroides* crescidos na presença de diferentes fontes de carbono.

Como mostra a tabela II o nível de LDHPNI no fungo em crescimento exponencial é significativo somente quando crescido na presença de lactato, confirmando o fato já observado por FUNAYAMA e ZANCAN (18). A razão de indução e a atividade específica da LDHPNI obtida com lactato é 14 a 75 vezes superior às obtidas com outras fontes de carbono.

### 3.3 - Efeito da glucose, glicerol, etanol e piruvato sobre a razão de indução em células de *Dactylium dendroides* em repouso.

A tabela III mostra que a razão de indução enzimática obtida com lactato como indutor, diminui quando se adiciona simultaneamente a este indutor uma outra fonte de carbono.

Essa diminuição que é da ordem de 40 a 80% sugere o aparecimento de um efeito repressor sobre a indução da síntese da LDHPNI pelo lactato.

#### 3.4 - Determinação da velocidade diferencial de síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente em células de *Dactylium dendroides* em crescimento na presença de lactato.

A inclinação da curva na figura 6 fornece a fração de enzima que é sintetizada em relação a fração de proteína total sintetizadas no mesmo intervalo de tempo, ou seja, fornece a velocidade diferencial de síntese que é da ordem de 15,5 mU/mg de proteína.

#### 3.5 - Indução da síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente em células de *Dactylium dendroides* em repouso por lactato.

A figura 7 mostra que a atividade específica começa aumentar logo a adição do indutor e atinge um valor 30 vezes superior ao basal em 4 horas, que permanece constante pelo menos por mais 5 horas. Durante este processo de indução ocorre a síntese preferencial da LDHPNI, na presença de lactato, e não se observa variações significativas do peso seco. Na ausência do indutor não se processa a síntese da enzima.

#### 3.6 - Efeito do etanol, glicerol, glucose e piruvato sobre a indução da síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente por lactato em células de *Dactylium dendroides* em repouso.

A figura 8 mostra que a cinética de indução da síntese da LDHPNI por lactato é alterada significativamente, quando a indução é realizada na presença simultânea do indutor e de uma outra fonte de carbono. Os valores de atividade específica da LDHPNI obtidos tres horas após a adição das misturas de glucose e lactato, etanol e lactato, glicerol e lactato, piruvato e lactato à suspensão de micélios jejuados, correspondem respectivamente a 20,32, 56 e 60% da atividade específica da LDHPNI obtida quando se utiliza o

lactato como única fonte de carbono. Estes resultados sugerem que a repressão da síntese desta enzima pode ser suscitada pelas diferentes fontes de carbono utilizadas.

### 3.7 - Efeito da cicloheximida sobre a indução da síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente, induzida por lactato em células de *Dactylium dendroides* em repouso

A figura 9 mostra que a presença de cicloheximida (20µg/ml da cultura) no tempo zero e às duas horas da adição do indutor, interrompe totalmente o aparecimento da atividade de LDHPNI. Estes dados indicam que durante este processo de indução a LDHPNI é sintetizada "de novo".

### 3.8 - Efeito da glucose sobre a L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente induzida em células de *Dactylium dendroides* em crescimento na presença de lactato.

A figura 10 mostra que quando se adiciona glucose a um cultivo de células em crescimento na presença de lactato, a atividade específica inicial que era da ordem de 180 mU/mg de proteína decresce significativamente atingindo um nível basal dentro de 12 horas. Por outro lado, células do cultivo controle, isto é, o mantido sem adição de glucose, mantém a atividade específica máxima constante, pelo menos por 18 horas. A figura 10 permite ainda o cálculo de mU totais em função do peso seco (mU/mg de proteína x mg de peso seco). As seis horas após a adição de glucose, as mU totais é da ordem de 2.240, valor que não difere significativamente das mU totais no tempo zero que é de 2.340. Entretanto, as doze horas da adição de glucose as mU totais decresce para 600.

Estes resultados sugerem que o decréscimo da atividade específica durante a primeira geração é devido a repressão e diluição da LDHPNI pelo crescimento na presença de glucose, uma vez que os resultados experimentais são bastante coincidentes com os valores da curva teórica. Na segunda geração a queda da atividade específica é devida a repressão, diluição pelo crescimento e de um fenômeno adicional que pode tratar-se de um processo da degradação da LDHPNI.

Nas gerações seguintes variações significativas da atividade específica não são observadas, provavelmente devido ao estado de equilíbrio atingido entre síntese e degradação da enzima pelo organismo nesta condição fisiológica.

### 3.9 - Efeito da concentração de glucose sobre a L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente induzida por lactato em células de *Dactylium dendroides* em repouso.

A figura 11 mostra que a adição de glucose a uma cultura de células de *Dactylium dendroides* em repouso, cuja síntese da LDHPNI fora previamente induzida, provoca um brusco decréscimo na atividade específica da ordem de 50% dentro de uma hora. Esse nível é mantido por pelo menos mais seis horas, quando a concentração de glucose adicionada era de 1%. Entretanto, quando a concentração de glucose era de 0,5%, já na segunda hora da sua adição, acontece uma recuperação gradativa da atividade específica, que atinge 95% do valor original no final do experimento. Estes resultados sugerem o aparecimento de um processo inativante reversível dependente da concentração de glucose.

### 3.10 - Efeito da adição simultânea da glucose e cicloheximida sobre a atividade de L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente induzida por lactato em células de *Dactylium dendroides* em repouso.

A figura 12 mostra que a adição simultânea de glucose e cicloheximida a uma cultura de *Dactylium dendroides*, não provocou decréscimo na atividade específica da LDHPNI, cuja síntese fora previamente efetivada na presença de lactato. Estes resultados indicam que o mecanismo de inativação da LDHPNI estimulado pela glucose é dependente da síntese proteica.

### 3.11 - Efeito sequencial da glucose e de cicloheximida sobre a atividade da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente induzida por lactato em células de *Dactylium dendroides* em repouso.

A figura 13 mostra que o decréscimo de atividade especí-

fica da LDHPNI causado pela adição de glucose é perfeitamente reversível na presença de cicloheximida. Desde que a cicloheximida é um inibidor da síntese proteica, a recuperação da atividade específica deve ser interpretada como uma reativação da LDHPNI.

**3.12 - Efeito do dibutiril AMPc sobre a atividade repressora e inibitória estimulada pela glucose durante a indução da síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente por lactato em células de *Dactylium dendroides* em repouso.**

A figura 14 mostra que o dibutiril-AMPc na concentração de 1 mM evita a queda de atividade específica da LDHPNI estimulada pela glucose, e que é capaz de reverter parcialmente o efeito repressor. Estes resultados sugerem a participação deste nucleotídeo na regulação destes mecanismos que controlam os níveis da LDHPNI in vivo.

TABELA I - Efeito de fontes de carbono nos tempos de geração e nas constantes de crescimento de *Dactylium dendroides*.

Fonte de carbono (1%)	Tempo de geração (h)	Constante de crescimento ( $h^{-1}$ )
Glucose	6	0,11
Etanol	8	0,08
Glicerol	8	0,08
Lactato	10	0,07
Piruvato	13	0,05

Para determinação do crescimento micelial em função de tempo, *Dactylium dendroides* foi crescido em meio M.M. conforme descrito no ítem 2.2.3 de Materiais e Métodos.

TABELA II - Níveis de L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente em células de *Dactylium dendroides* crescidas na presença de diferentes fontes de carbono.

SUBSTRATO	ATIVIDADE ESPECÍFICA (mU/mg de proteína)	RAZÃO DE INDUÇÃO
Lactato	150	50,0
Glucose	3	1,0
Glicerol	2	0,66
Etanol	4	1,33
Piruvato	11	3,66

O fungo foi crescido em meio M.M. contendo diferentes fontes de carbono e incubados em agitador rotatório (100 rpm) a 28°C por um período de 48 horas.

Amostras de micélios foram coletados e seus extratos utilizados para determinação da atividade específica da LDHPNI.

TABELA III - Efeito da glucose, glicerol, etanol e piruvato sobre a razão de indução em células de *Dactylium dendroides* em repouso.

FONTE DE CARBONO	LDHPNI ATIVIDADE ESPECÍFICA (mU/mg de proteína)	RAZÃO DE INDUÇÃO
Lactato	113	37,6
Glucose	3	1,0
Glucose + lactato	22	7,3
Glicerol + lactato	62	20,6
Etanol + lactato	36	12,0
Piruvato + lactato	67	22,0

Todas as fontes de carbono foram utilizadas à concentração final de 1%.

Suspensão de micélios (600 ml) de *Dactylium dendroides* jejuadas foi obtida como descrito no ítem 2.2.4 de Materiais e Métodos e frações de 100 ml foram distribuídas em frascos erlenmeyer de 250 ml. Cada frasco foi adicionado de uma fonte de carbono ou de uma mistura de duas delas como indicado na tabela. A cultura foi então incubada em agitador rotatório (100 rpm) a 28°C por 4 horas, os micélios foram coletados e seus extratos utilizados para determinação da atividade específica da LDHPNI.

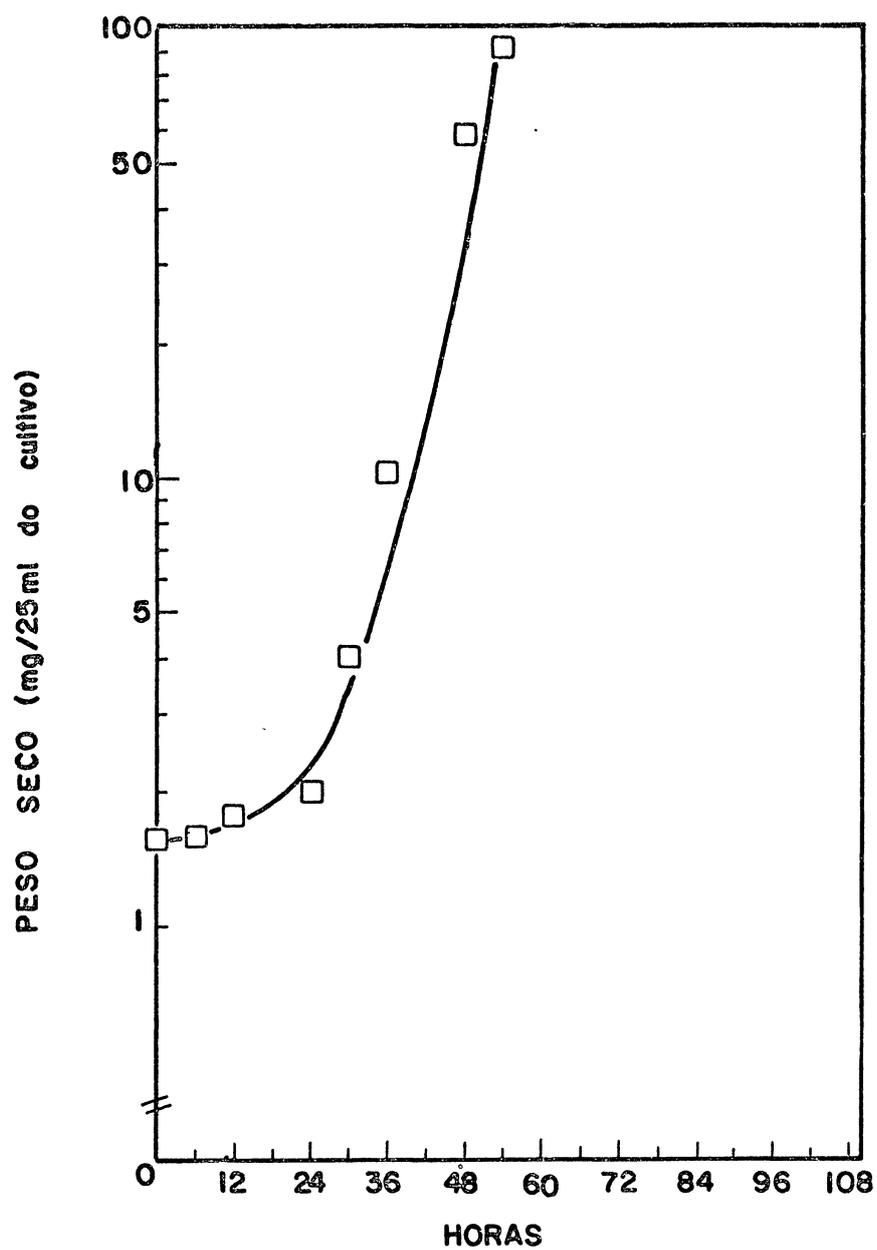


FIGURA 1 - Curva de crescimento de *Dactylium dendroides* em presença de glicose. O fungo foi crescido como descrito no ítem 2.2.3 de Materiais e Métodos.

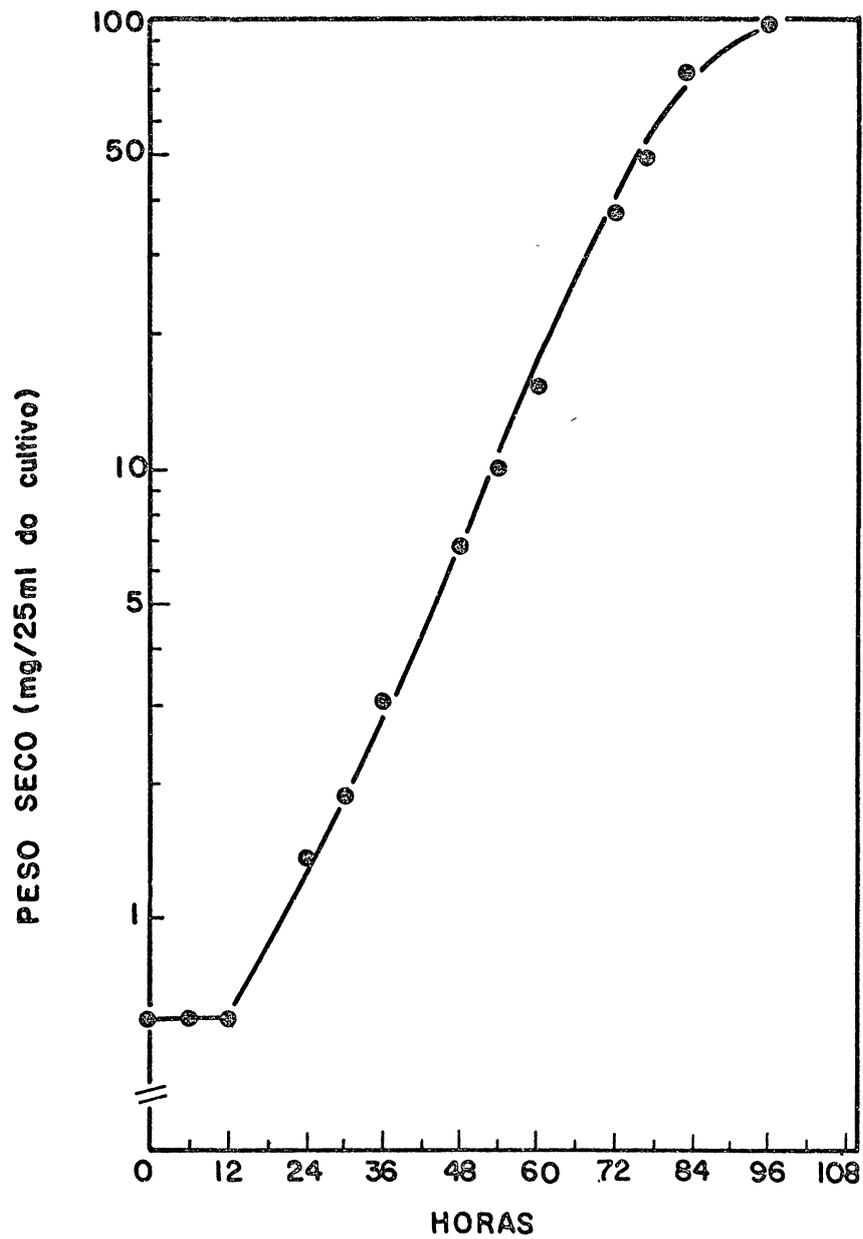


FIGURA 2 - Curva de crescimento de *Dactylium dendroides* em presença de lactato de sódio. O fungo foi crescido como descrito no ítem 2.2.3 de Materiais e Métodos.

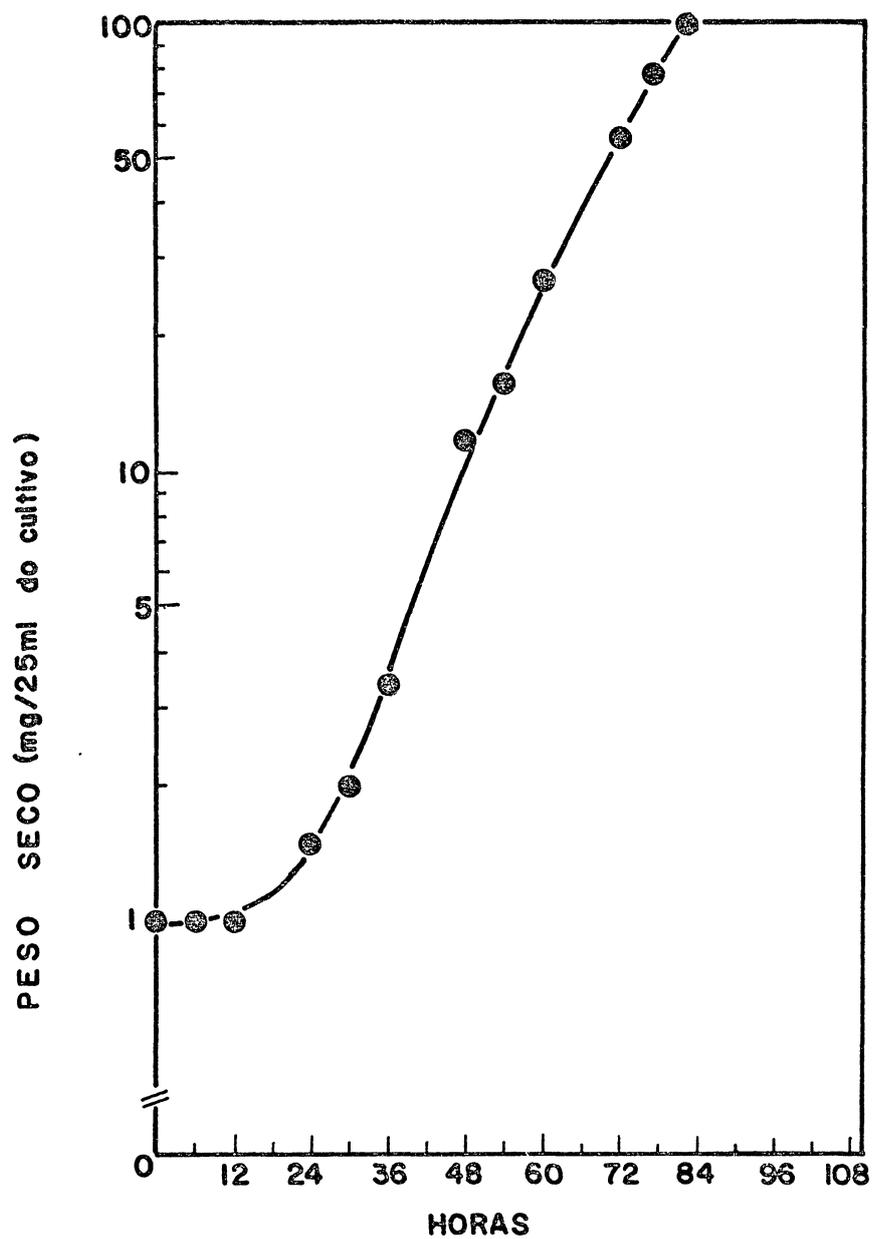


FIGURA 3 - Curva de crescimento de *Dactylium dendroides* em presença de glicerol. O fungo foi crescido como descrito no i tem 2.2.3 de Materiais e Métodos.

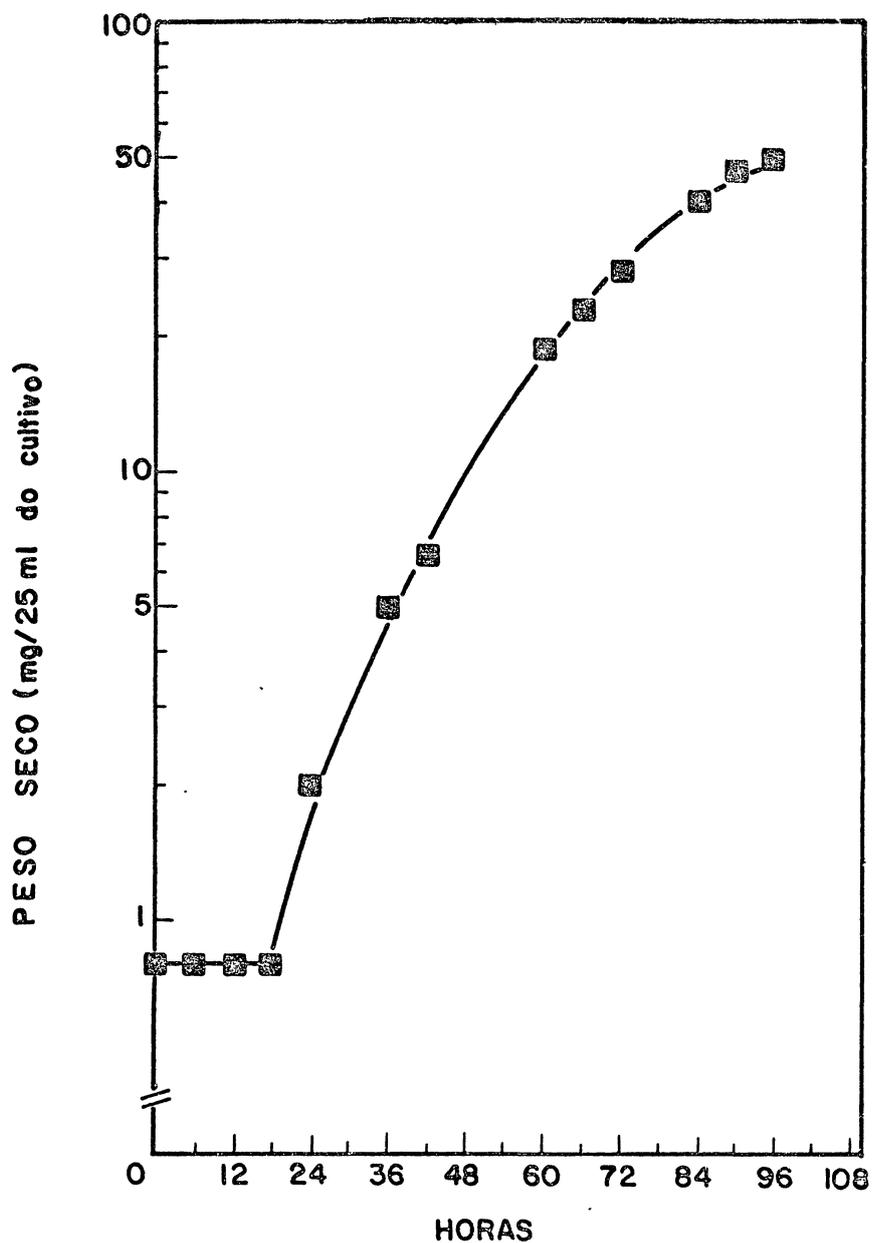


FIGURA 4 - Curva de crescimento de *Dactylium dendroides* em presença de etanol. O fungo foi crescido como descrito no ítem 2.2.3 de Materiais e Métodos.

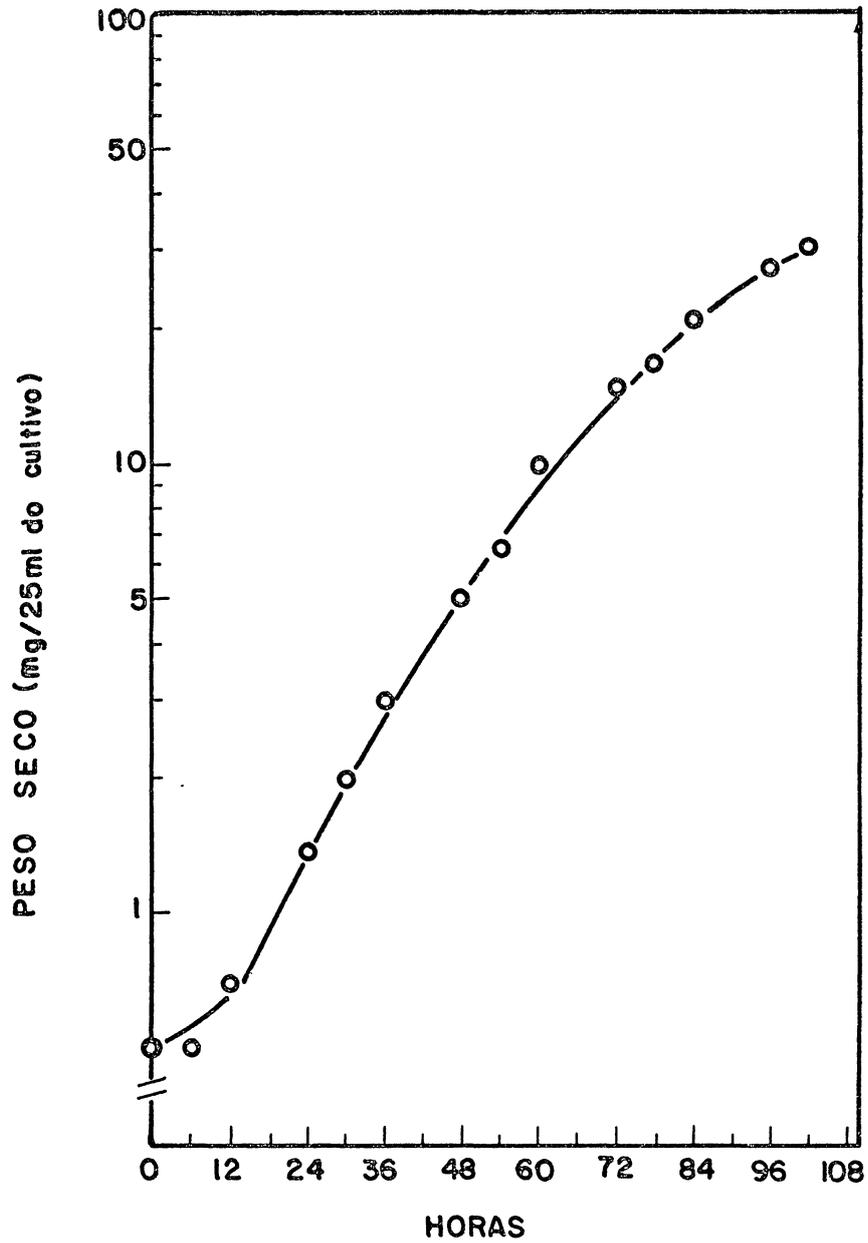


FIGURA 5 - Curva de crescimento de *Dactylium dendroides* em presença de piruvato. O fungo foi crescido como descrito no í tem 2.2.3 de Materiais e Métodos.

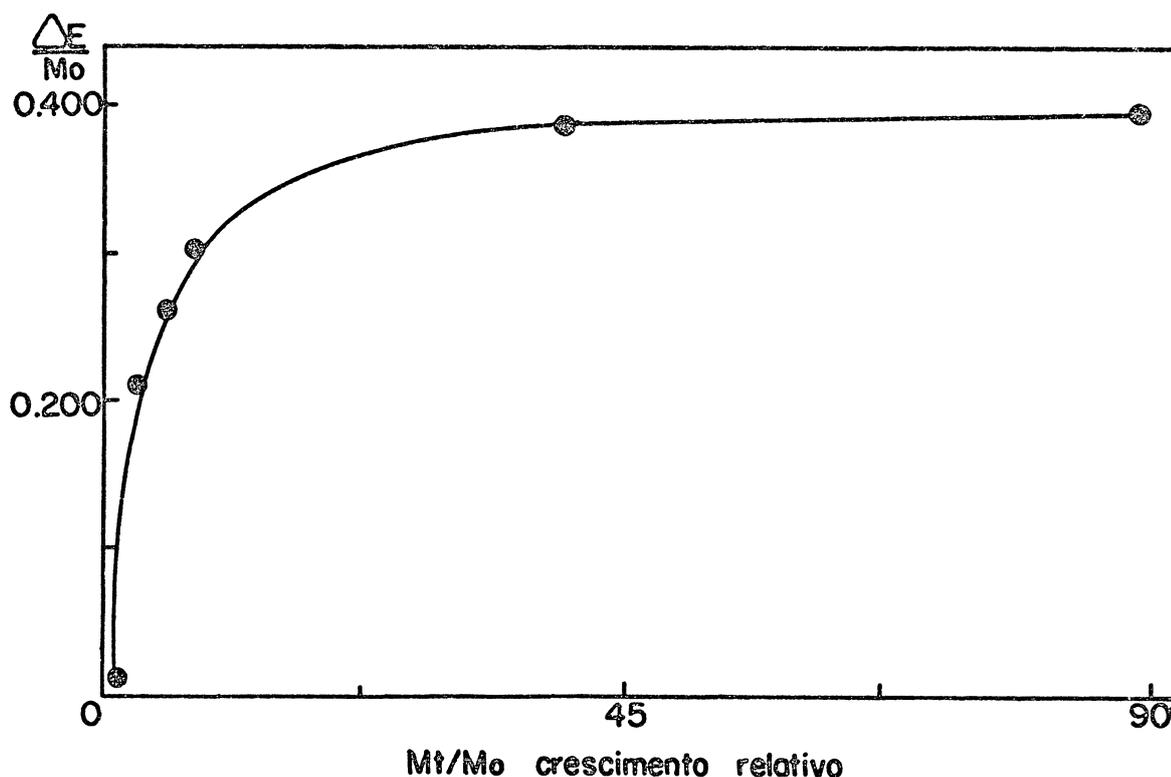


FIGURA 6 - Determinação da velocidade diferencial da síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente em células de *Dactylium dendroides* em crescimento na presença de lactato.

Os micélios foram crescidos em 200 ml de meio M.M. a 28°C contendo 1% de lactato de sódio. A aeração foi realizada por agitação constante em agitador rotatório (100 rpm). Nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, amostras de 3 e 12 ml do cultivo foram coletados e os micélios utilizados para dosagem de proteínas em células inteiras e para determinação da atividade específica da LDHPNI.

Mt = massa de proteína total do micélio por ml do cultivo.

Mo = massa de proteína total do micélio por ml do cultivo no tempo zero.

$\Delta E$  = incremento da atividade enzimática (unidades/ml do cultivo) entre duas amostragem consecutivas.

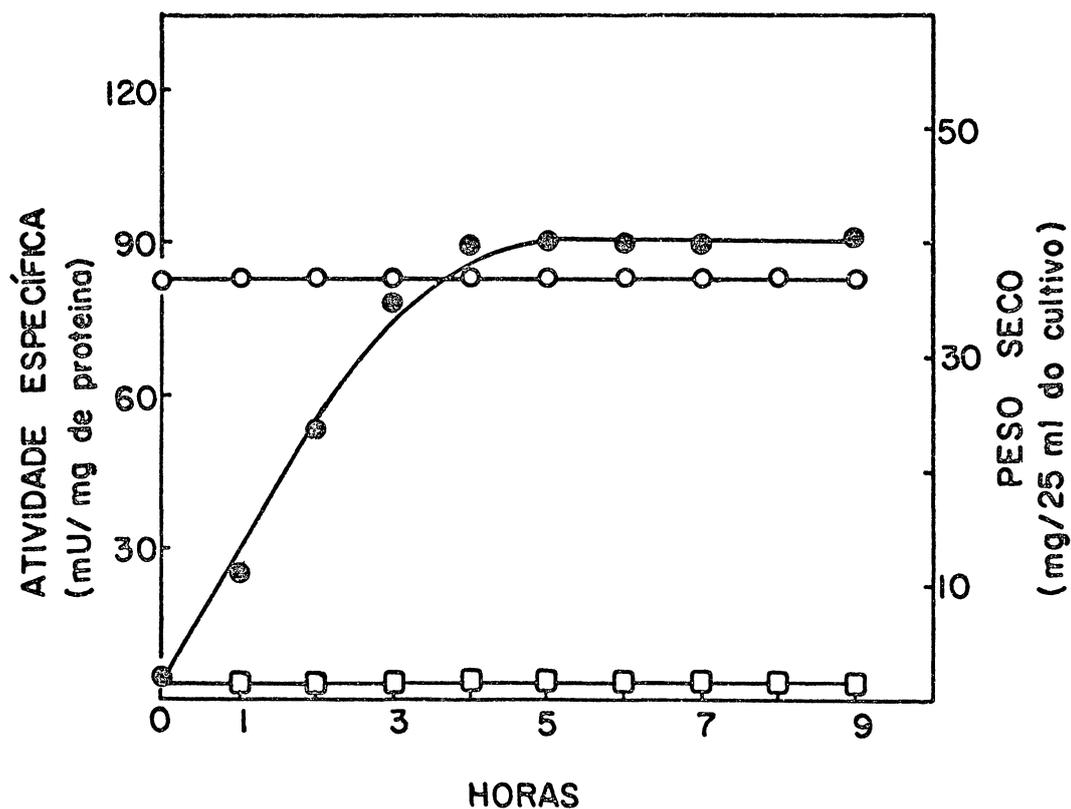


FIGURA 7 - Indução da síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente em células de *Dactylium dendroides* em repouso por lactato.

Uma suspensão de micélios (600 ml) de *Dactylium dendroides* jejuados obtida como descrito no Ítem 2.2.4 de Materiais e Métodos foi distribuída em dois frascos erlenmeyer de 2 litros. A indução foi realizada na presença de lactato de sódio (1%), nas mesmas condições de agitação e temperatura utilizadas durante o jejum. Nos tempos indicados amostras foram coletadas para a determinação do crescimento das células induzidas na presença de lactato (○—○) e para a determinação da atividade específica da LDHPNI da cultura controle (□—□) e da induzida na presença de lactato (●—●).

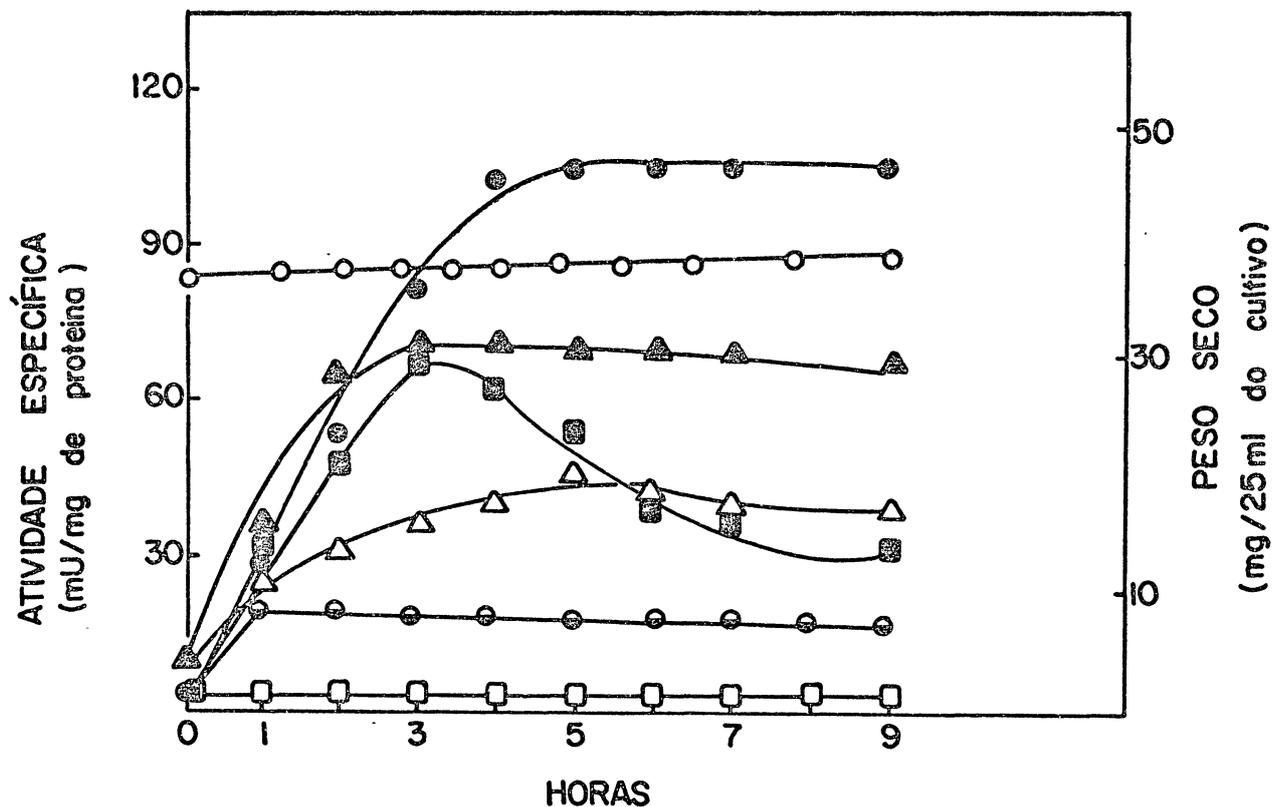


FIGURA 8 - Efeito do etanol, glicerol, glucose e piruvato sobre a indução da síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente por lactato em células de *Dactylium dendroides* em repouso.

Volumes de 200 ml da suspensão em micélios de *Dactylium dendroides* jejuados para indução da LDHPNI, obtidos como descrito no ítem 2.2.4 de Materiais e Métodos, foram transferidos para seis frascos erlenmeyer de 1 litro. A indução foi realizada na presença de lactato de sódio (1%), e ainda, na presença de misturas de lactato e uma outra fonte de carbono, nas mesmas condições de agitação e temperatura utilizadas durante o jejum. Nos tempos indicados amostras foram coletadas para a determinação de peso seco das células induzidas na presença de lactato (○—○) e para determinação da atividade específica da LDHPNI da cultura controle (□—□) e das culturas induzidas na presença de lactato (●—●) e na presença de misturas de lactato mais etanol (▲—▲), lactato mais glicerol (■—■), lactato mais glucose (◐—◐), e lactato mais piruvato (▲—▲).

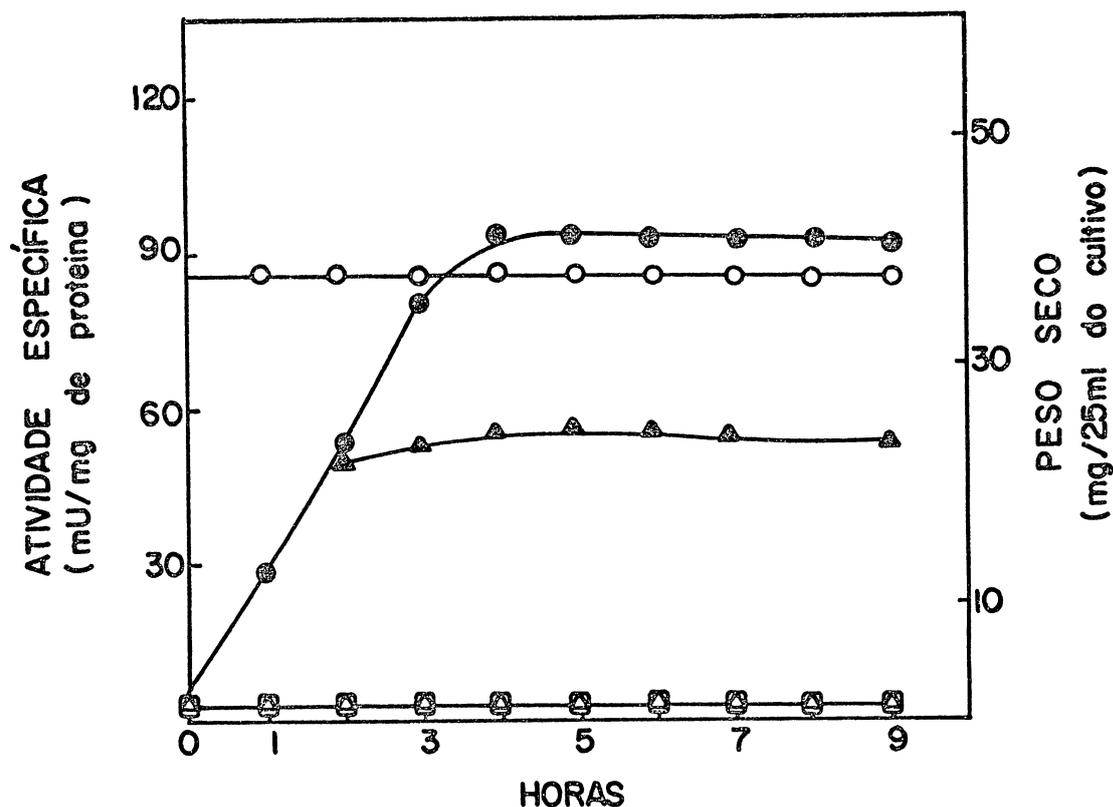


FIGURA 9 - Efeito da cicloheximida sobre a indução da síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente induzida por lactato em células de *Dactylium dendroides* em repouso.

A indução da síntese da LDHPNI foi realizada pela adição de lactato de sódio (1%) à uma suspensão de micélios jejuados, obtida como descrito no ítem 2.2.4 de Materiais e Métodos. Duas horas após a adição do indutor, 200 ml desta cultura foram transferidos para um frasco erlenmeyer de 1 litro e adicionada de 20  $\mu$ g de cicloheximida por ml da cultura ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ); a cultura original restante foi utilizada como controle ( $\bullet$ — $\bullet$ ). A curva ( $\triangle$ — $\triangle$ ) mostra o nível de LDHPNI mantido pelo micélio, cuja suspensão foi adicionada de lactato de sódio (1%) e de cicloheximida (20  $\mu$ g por ml da cultura) no tempo zero. O nível de LDHPNI mantido pelo micélio em jejum é representado pela curva ( $\square$ — $\square$ ) e o crescimento pela curva ( $\circ$ — $\circ$ ). Estes experimentos foram realizados nas mesmas condições de agitação e temperatura utilizados durante o jejum. Nos tempos indicados amostras foram coletadas para determinação do peso seco e da atividade específica da LDHPNI.

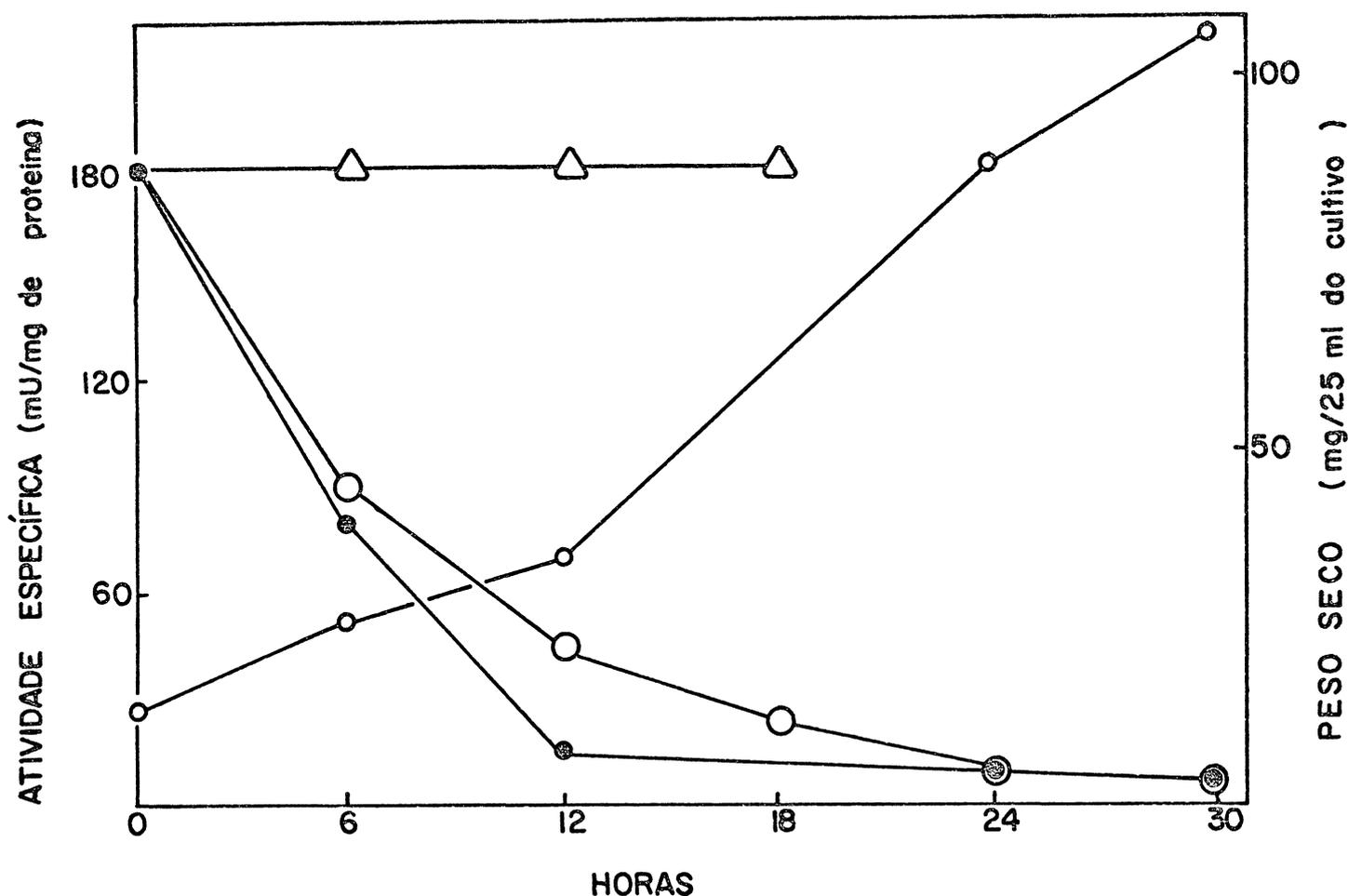


FIGURA 10 - Efeito da glucose sobre a L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente induzida em células de *Dactylium dendroides* em crescimento na presença de lactato.

O fungo foi crescido por 48 horas na presença de lactato de sódio a 1% como descrito em Materiais e Métodos. Após crescimento a cultura foi dividida em duas alíquotas. À primeira adicionou-se glucose à concentração final de 1% e a segunda mantida sem adição. As condições de crescimento foram mantidas e nos tempos indicados na figura micélios foram coletados para determinação de peso seco (○—○) e medida de atividade específica na presença de glucose (●—●) e ausência de glucose (Δ—Δ). A curva (○—○) é teórica e representa a diluição da enzima por crescimento.

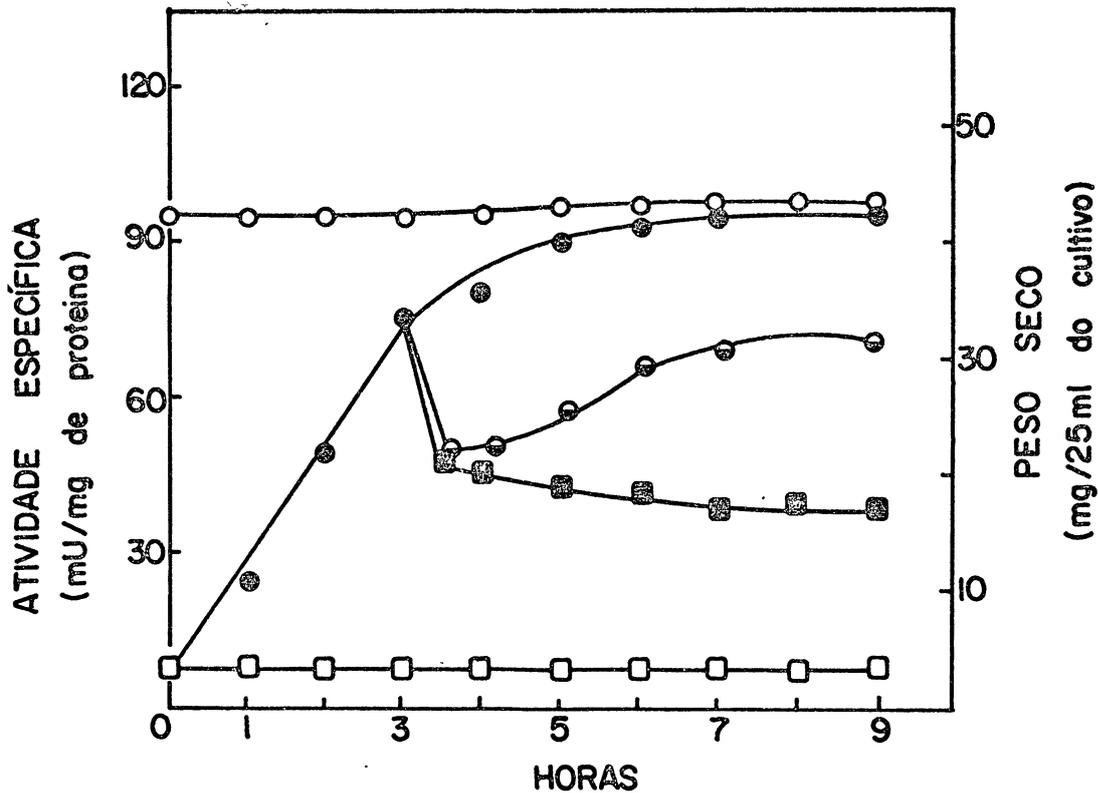


FIGURA 11 - Efeito da concentração de glicose sobre a L-lactato de hidrogenase piridino nucleotídeo independente induzida por lactato em células de *Dactylium dendroides* em repouso.

Uma suspensão de micélios jejuados (600 ml), obtida como descrito no item 2.2.4 de Materiais e Métodos, foi utilizada para a indução da síntese da LDHPNI por lactato de sódio (●—●). Três horas após a adição do indutor, alíquotas desta cultura foram transferidas para outros dois frascos e adicionados de glicose nas concentrações de 0,5% (○—○) e 1% (■—■); a alíquota do frasco original foi utilizada como controle. A curva (◻—◻) representa o nível de LDHPNI do micélio mantido em jejum e a curva (○—○) o crescimento dos micélios de *Dactylium dendroides* induzidos na presença de lactato. Durante estes experimentos foram mantidas as mesmas condições de agitação e temperatura utilizadas durante o jejum. Nos tempos indicados amostras foram coletadas para determinação do peso seco e da atividade específica da LDHPNI.

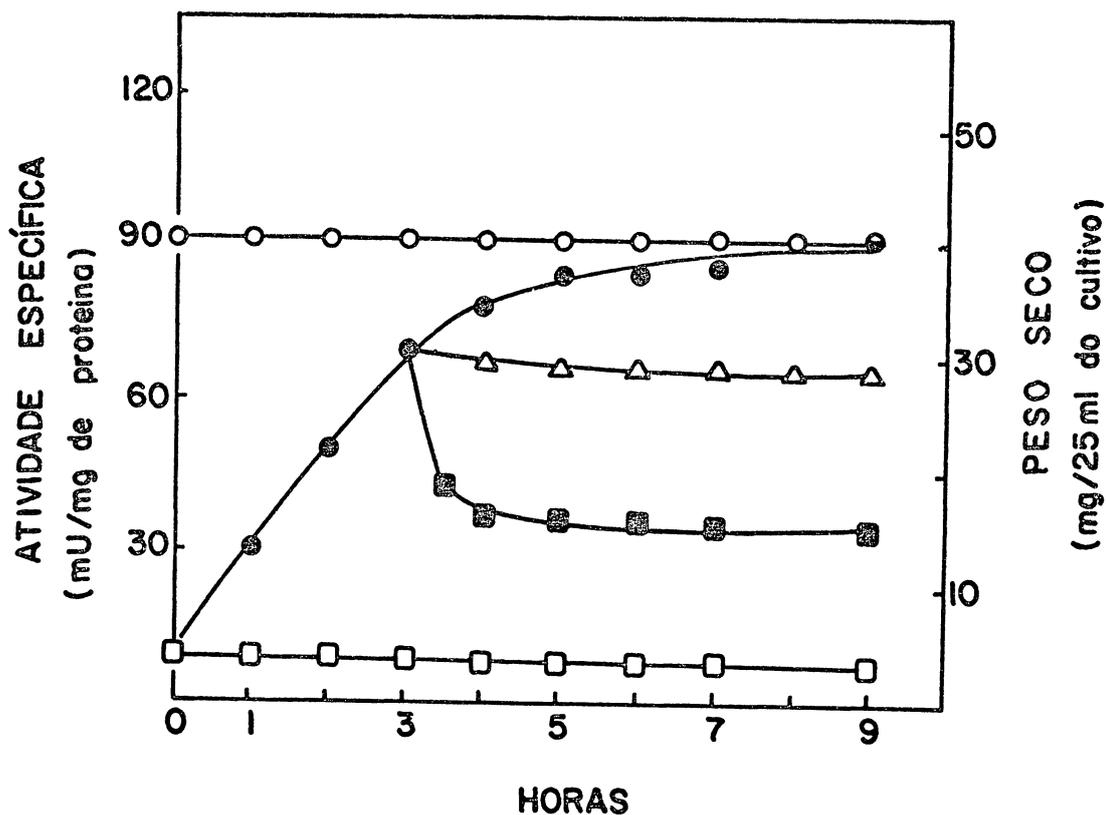


FIGURA 12 - Efeito da adição simultânea da glucose e cicloheximida sobre a atividade de L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente induzida por lactato em células de *Dactylium dendroides* em repouso.

A indução da síntese de LDHPNI foi realizada pela adição de lactato de sódio (1%) a uma suspensão de micélios jejuados obtida como descrito no ítem 2.2.4 de Materiais e Métodos. Tres horas após a adição do indutor, alíquotas desta cultura foram transferidos para outros dois frascos. Uma destas alíquotas foi adicionada de glucose na concentração de 1% (■—■), a outra de uma mistura de glucose e cicloheximida (△—△) na concentração de 1% e 20 µg/ml da cultura, respectivamente; a alíquota do frasco original foi utilizada como controle (●—●). A curva (□—□) representa o nível de LDHPNI mantido pelo micélio em jejum e a curva (○—○) o crescimento dos micélios induzidos na presença de lactato. Estes experimentos foram realizados sob as mesmas condições de agitação e temperatura utilizadas durante o jejum. Nos tempos indicados amostras foram coletadas para determinação do peso seco e da atividade específica da LDHPNI.

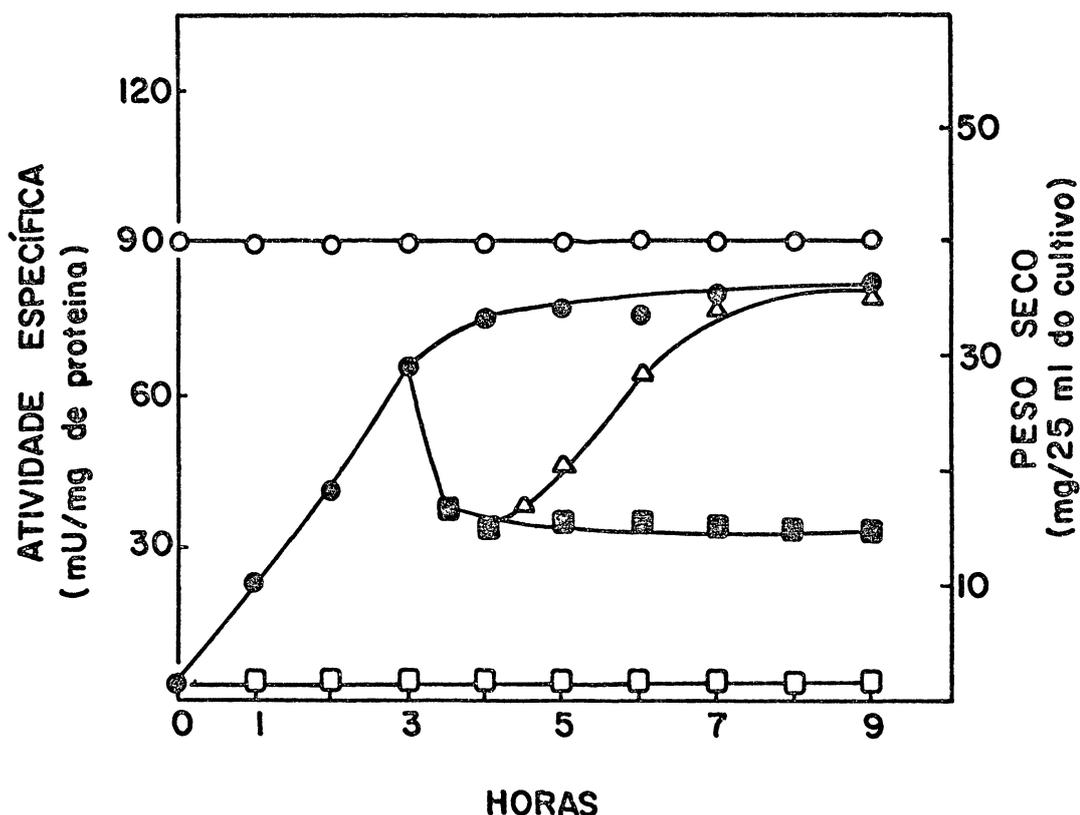


FIGURA 13 - Efeito sequencial da glucose e cicloheximida sobre a atividade da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente induzida por lactato em células de *Dactylium dendroides* em repouso.

Uma suspensão de micélios jejuados (600 ml), obtida como descrito no ítem 2.2. 4 de Materiais e Métodos foi utilizada para a indução da LDHPNI por lactato de sódio (●—●). Tres horas após a adição do indutor, uma alíquota desta cultura foi transferida para um outro frascó e adicionada de glucose na concentração de 1% (■—■) e as uma hora da adição de glucose, a cultura foi acrescentada de cicloheximida na concentração de 20 µg/ml da cultura (Δ—Δ). A curva (◻—◻) mostra o nível da LDHPNI mantidos pelos micélios em jejum e a curva (o—o) o crescimento das células induzidas na presença de lactato. Nos tempos indicados amostras foram coletadas para determinação da atividade específica e do peso seco.

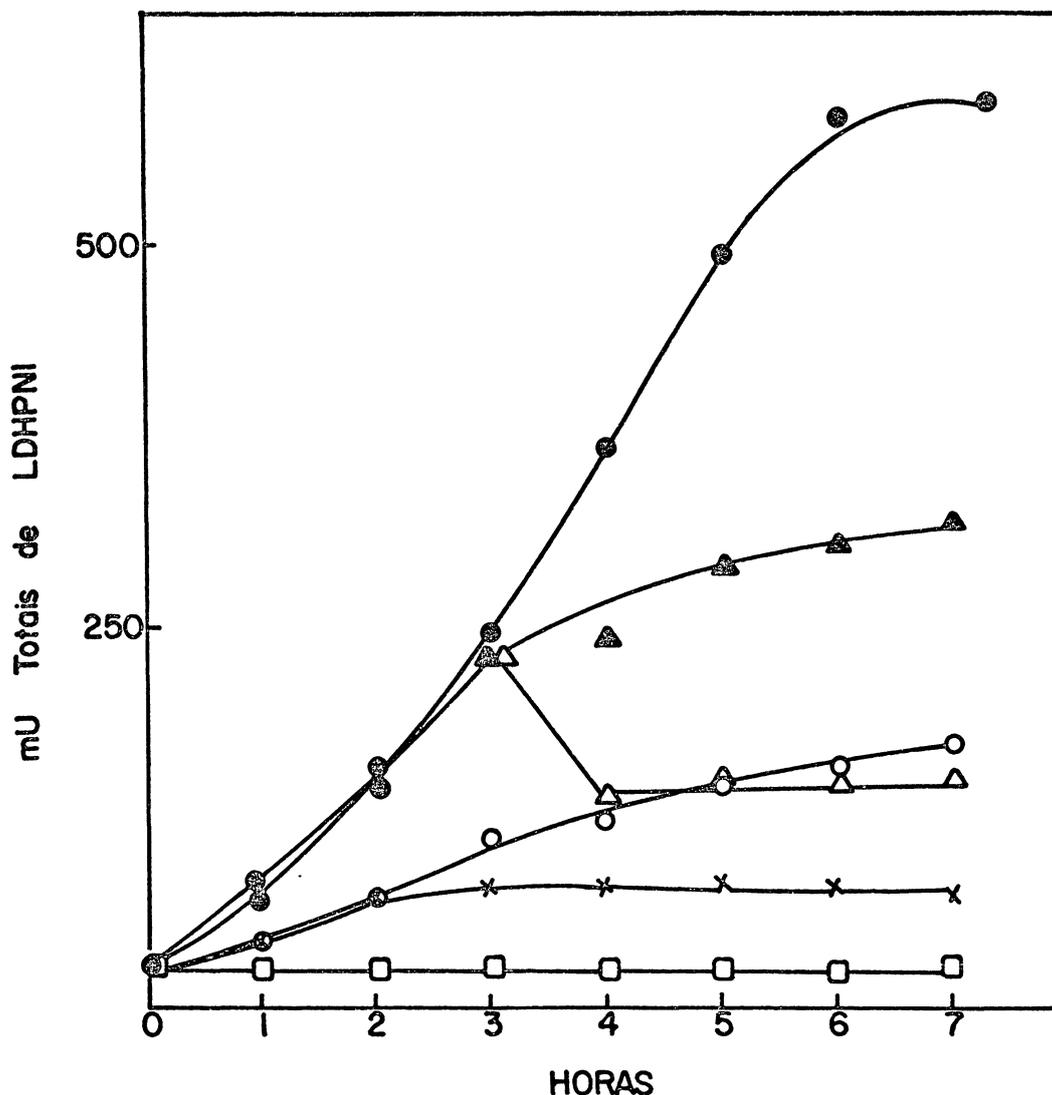


FIGURA 14 - Efeito do dibutiril AMPc sobre a atividade repressora e inibitória estimulada pela glucose durante a indução da síntese da L-lactato desidrogenase piridino nucleotídeo independente por lactato em células de *Dactylium dendroides* em repouso.

A suspensão de micélio jejuadas foi obtida como descrito no ítem 2.2.4 de Materiais e Métodos. A indução da síntese da LDHPNI foi realizada na ausência (□—□) e na presença de lactato de sódio (●—●). Tres horas após a adição do indutor, alíquotas da suspensão correspondente foram transferidas para outros dois frascos e adicionada de glucose (△—△) e da mistura de glucose e AMPc (▲—▲). A indução foi também realizada na presença das misturas de lactato e glucose (x—x) e de lactato, glucose e AMPc (o—o). As concentrações de AMPc, glucose e lactato utilizadas em qualquer dos casos foram 1 mM, 1% e 1% respectivamente. Estes experimentos foram realizados sob as mesmas condições de agitação e temperatura, utilizadas durante o jejum. Nos tempos indicados nas amostras foram coletados para determinação das mU totais de LDHPNI.

#### 4 - DISCUSSÃO

## DISCUSSÃO

Quase não existem dados na literatura a respeito da LDHPNI produzida por microorganismos. Somente estudos de caracterização e purificação tem sido realizados em levedura (50), bactérias (58, 63, 64, 72) e fungos (81). Apenas tres destas enzimas, as L-lactato desidrogenases NAD<sup>+</sup>-independente de *Rhizopus oryzae* (58), de *Lactobacillus arabinosus* (63, 64) e a desidrogenase lactica de *Pericularia oryzae* (81) assemelham-se à produzida por *Polyporus circinatus* (*Dactylium dendroides*) identificada por FUNAYAMA e ZANCAN em 1974 (18).

O fungo *Dactylium dendroides*, metaboliza eficientemente qualquer das fontes de carbono (figuras 1-5 e tabela I) empregadas para sua proliferação. Entretanto, o nível da LDHPNI é significativo (tabela II) somente quando o fungo foi crescido na presença de lactato de sódio a 1%, confirmando o fato já observado por FUNAYAMA e ZANCAN (18).

A atividade de algumas enzimas induzíveis em microorganismos podem ser detectadas mesmo na ausência do indutor (78). Considerando essa possibilidade, preferiu-se determinar a razão de indução que permite uma melhor apreciação do efeito indutor. Os valores da razão de indução para a LDHPNI da tabela II mostra inequivocamente que o lactato é o indutor por excelência, dentre as fontes de carbono testadas.

A cinética de indução enzimática possui certos parâmetros como o período de lag de indução, a velocidade diferencial de síntese e o nível máximo de indução que variam muito de um organismo para outro e em um mesmo organismo dependendo das condições fisiológicas em que a indução é realizada. Essas variações podem ser muito bem avaliadas com a indução da  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) de *Escherichia coli* (38) e de *Kluyveromyces lactis* (10), da galactotquinase (EC 2.7.1.6), (1),  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) (33), e álcool desidrogenase (EC 1.1.1.2) (8) de *Saccharomyces cerevisiae* e da  $\beta$ -1,3-glucanase (EC 3.2.1.59) do Basidiomiceto QM 806 (15).

A indução da LDHPNI em *Dactylium dendroides* mostrou ca-

racterísticas extremamente interessantes. Por exemplo, um lag de indução da ordem de 12 horas e com valor de atividade específica de 72 mU/mg de proteína, foi observado somente em células em crescimento na presença de lactato, coincidindo portanto com o lag da curva de crescimento.

A velocidade diferencial de síntese é um parâmetro de indução, definida como sendo a fração de enzima que é sintetizada em relação a fração de proteína total sintetizada no mesmo intervalo de tempo (53). A inclinação da curva da figura 6, fornece a velocidade diferencial de síntese da LDHPNI que é da ordem de 15,5 mU / mg de proteína. Pela análise gráfica dessa figura 6 é facilmente compreensível que durante a primeira geração, a fração de enzima sintetizada em relação a da proteína total é maior, para preencher a necessidade das células em biossintetizar imediatamente um novo equipamento enzimático para metabolizar o substrato até então para elas desconhecido. As gerações seguintes entretanto, tendem a produzir a enzima em proporções decrescentes em relação a proteína total até atingir uma velocidade diferencial constante a qual indica que todas as células estão plenamente adaptadas à condição fisiológicas agora submetida. Entretanto, quando a indução da LDHPNI era realizada com células em repouso previamente jejuadas, logo na primeira hora após a adição do lactato, a atividade específica atingida era em torno de 10 vezes superior a basal (figura 7), sugerindo que a indução da síntese se inicia quase que imediatamente, após a adição de lactato. A supressão do lag de indução nas células em repouso provavelmente se deva ao jejum de 15 horas a que foram submetidas as células pré-crescidas em glucose, uma vez que a glucose endógena de células não jejuadas possivelmente interferiria neste estudo dado o seu efeito repressor.

O nível máximo de indução enzimática da LDHPNI, expresso em atividade específica nas células de *Dactylium dendroides* em crescimento exponencial não difere significativamente das células em repouso, sendo em ambos os casos da ordem de 90-120 mU por mg de proteína.

A cicloheximida é um antibiótico muito utilizado no estudo de inibição da síntese de proteínas (62, 21, 29, 30). Com o objetivo de esclarecer como a atividade de LDHPNI se faz presente em células em *Dactylium dendroides* pré-crescidas em glucose pela adição de lactato, experimentos com cicloheximida foram conduzidos nesse sentido. Se na presença de cicloheximida e de lactato a atividade específica da enzima for crescente como a verificada na presença de lactato somente, poder-se-ia pensar na possibilidade de reativação de alguma proteína enzima com atividade de LDHPNI. Entretanto, os dados da figura 9 mostram de maneira incontestável dentro dos conhecimentos atuais que o aparecimento de atividade enzimática não é devido a uma reativação e sim a síntese de novo da enzima. Observe-se que a adição da cicloheximida juntamente com lactato ao cultivo, impede o aparecimento da atividade de LDHPNI e quando adicionada 2 horas após a adição do indutor a atividade específica que era da ordem de 50 mU/mg de proteína mantém-se praticamente constante.

Como hipótese de trabalho existe a possibilidade do lactato permitir a síntese de um fator proteico pelas células de *Dactylium dendroides* pré-crescidas em glucose, que poderia então reativar a suposta proteína-enzima pré-existente com a atividade de LDHPNI inibida. De qualquer maneira dentro dessa hipótese de trabalho, o antibiótico atuaria também inibindo a síntese proteica, se bem que do suposto fator proteico e não da enzima em questão.

A redução na velocidade de síntese induzida de uma proteína-enzima na presença de glucose foi por alguns conhecida como "efeito da glucose" (36). Esse efeito atualmente conhecido por "repressão catabólica" (38) manifesta-se de maneira tão variada que se admite a existência de pelo menos quatro mecanismos diferentes; a saber: repressão catabólica permanente, repressão catabólica transitória, inibição e a inativação catabólica.

Os dois primeiros mecanismos tem sido estudados extensivamente durante a indução da  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) de *Escherichia coli* (38,56,68) e da galactoquinase (EC 2.7.1.6) de leveduras (1, 57, 71) e da  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase de *Bacillus subtilis* (52).

Como a bibliografia especializada carece de dados conclusivos e a existência de alguns dados conflitantes com relação à

participação do produto do gen i (proteína repressora) e do AMPc na repressão da síntese e na reversão deste processo respectivamente, não é possível uma interpretação clara e lógica destes fenômenos.

A indução da síntese da LDHPNI por lactato em células de *Dactylium dendroides* em crescimento ou em repouso sofrem acentuada repressão catabólica por glucose. Fontes de carbono gluconeogênicas como etanol, glicerol e piruvato exercem também um efeito repressor sobre a indução promovida pelo lactato, (figura 8 e tabela III). Como estes resultados mostram que diferentes fontes de carbono podem suscitar o aparecimento desse efeito repressor é lógico se pensar na possibilidade que diferentes metabólitos atuam a um mesmo nível molecular (gen regulador, promotor ou operador). É claro que não se pode descartar a possibilidade que cada um dos reguladores até então conhecidos possam ser estimulados especificamente pelo metabólito correspondente.

Nessa sequência de raciocínio admite-se que a repressão catabólica é a resultante de alguns mecanismos similares que regulam a síntese enzimática.

Os níveis enzimáticos de uma variedade de enzimas podem ser também regulados por mecanismos de inativação suscitados pela adição de glucose ao meio. Eventos bioquímicos envolvendo um rápido desaparecimento das enzimas pela adição de glucose ao cultivo tem sido descrito em leveduras (14, 26, 48, 60, 61) em bactérias (2, 13) e em fungos (15). Alguns resultados já se tem conseguido numa tentativa para provar os mecanismos que regulam a inativação das enzimas, porém é certo que as enzimas não são reguladas por um único mecanismo. Muitos casos de inativação seletiva de enzimas em procariontes e eucariontes tem sido analisados (67). E o mecanismo através do qual ocorre rápido decréscimo na atividade específica de certas enzimas é classificado em duas categorias: inativação reversível e inativação irreversível. Na inativação reversível pode ocorrer um processo de adenililação e de deadenililação como na glutamina sintetase (EC 6.3.1.2) em *Escherichia coli* (66), acetilação e deacetilação de citrato liase (EC 4.2.1.4) em *Rhodospseudomonas gelatinosa* (23, 24) e

a fosforilação e desfosforilação da piruvato desidrogenase (EC 1.2.2.2) de músculo cardíaco (74).

O mecanismo de inativação irreversível embora tenha recebido grande atenção pouco ou quase nada se sabe sobre ele. Tem-se sugerido que neste mecanismo haja participação de um processo proteolítico (17, 26, 28). Algumas das enzimas que sofrem o processo de inativação irreversível pela adição de glucose ao cultivo são: a  $\alpha$ -glucosidase (EC 3.3.1.20), (25); frutose-1,6-difosfatase (EC 3.1.3.11), (16, 27); isocitrato liase (EC 4.1.3.1), (42); malato desidrogenase citoplasmática (EC 1.1.1.37), (79); todas de *Saccharomyces cerevisiae*, e a frutose-1,6-difosfatase (EC 3.1.3.11), (75) de *Saccharomyces carlsbergensis*.

O termo "inativação catabólica" foi empregado pela primeira vez por HOLZER (29) para descrever o rápido decréscimo da atividade específica destas enzimas pela adição de glucose ao cultivo.

Com o intuito de verificar algum efeito da glucose que fosse distinto ao da repressão catabólica sobre o nível da LDHPNI em células de *Dactylium dendroides* em crescimento na presença de lactato e em células em repouso, cuja síntese fora efetivada pelo indutor, foram utilizados experimentos que permitisse discriminação apreciável dos fenômenos. Quando se adiciona glucose a um cultivo de células em crescimento na presença de lactato (figura 10), a atividade específica inicial decresce significativamente atingindo um nível basal dentro de 12 horas. As células do cultivo controle entretanto, mantêm a atividade específica máxima constante pelo menos por 18 horas. Se a glucose estimulasse somente a repressão da síntese da LDHPNI, a queda da atividade específica seria traduzida pela simples diluição da enzima pelo crescimento do fungo, de acordo com a curva teórica da figura 10. Esta possibilidade por ser real durante a primeira geração, já que as mU totais no tempo zero e às seis horas da adição da glucose, não diferem significativamente e são da

ordem de 2.340 e 2.240 mU, respectivamente. Entretanto, na geração seguinte as mU totais, foram reduzidos para 600. Desde que este decréscimo de atividade específica não foi acompanhado por um crescimento celular proporcional, é lógico admitir a participação de um outro fenômeno distinto da repressão e da simples diluição da LDHPNI pelo crescimento do fungo.

A adição de glucose a um cultivo de células em repouso, cuja síntese da LDHPNI fora previamente induzida (figura 11) provoca um brusco decréscimo na atividade específica da ordem de 50% dentro de 1 hora e esse nível mantém-se por pelo menos mais de 8 horas, quando a concentração de glucose adicionada era de 1%. Esse decréscimo observado com células em repouso não deve por sua vez, ser interpretado como diluição da enzima pré-existente pelo crescimento, uma vez que durante todo experimento não se verificou variação significativa da massa celular. Supondo que somente a repressão catabólica acontecesse pela adição da glucose, a atividade específica deveria manter-se contante; por outro lado o decréscimo verificado não deve ser atribuído à instabilidade da enzima uma vez que na ausência de glucose o nível enzimático máximo atingindo pela indução permanece constante por pelo menos 72 horas. É lógico portanto admitir que a glucose suscita além da repressão catabólica um mecanismo de inativação quando adicionada à culturas de *Dactylium dendroides* em crescimento ou em repouso, nas quais a indução da síntese da LDHPNI, está se processando na presença de lactado de sódio. A inativação da LDHPNI estimulada pela glucose em células em repouso é virtualmente mais rápida que nas células em crescimento. Isto provavelmente se deve ao fato de que células sob condições fisiológicas em que ocorre um estado de transição de utilização de diferentes fontes de carbono ao mesmo tempo, exalta as atividades inativantes do organismo (26, 61).

A adição simultânea de glucose e cicloheximida (figura 12) a uma cultura do fungo, cuja síntese da LDHPNI fora efetivada na presença de lactato, não provoca decréscimo da atividade específica, sugerindo que o mecanismo de inativação é dependente da sín

tese proteica. Por outro lado, a cicloheximida quando adicionada logo após a inativação ter-se efetivado permite a recuperação quase total da atividade da enzima (figura 13). Estes resultados em conjunto indicam que a utilização da glucose pelo fungo permite a síntese de um fator inativante da LDHPNI de natureza proteica. A quase imediata recuperação de atividade específica pela adição de cicloheximida (figura 13) sugere que o proposto fator inativante possui uma vida média muito curta. O nível enzimático da LDHPNI após a inativação permanece constante se houver concentração suficientemente alta de glucose que permite a síntese do fator inativante. Nos experimentos em que a concentração inicial de glucose era de 1%, após a inativação ter-se efetuado, sua concentração era da ordem de 0,7% na primeira hora e de 0,4% na sexta hora de sua adição.

A figura 11, mostra que utilizando baixa concentração de glucose (0,5%), o processo é parcialmente reversível mesmo na ausência de cicloheximida, confirmando portanto os resultados anteriores. Fato idêntico tem sido verificado com a inativação da glicogênio fosforilase (EC 2.4.1.1) de *Dactylium dendroides* (51) na presença de glucose. O processo é revertido à medida que a glucose é exaurida do meio.

Sabe-se da existência de uma proteína de peso molecular de 45.000 (73) que uma vez ligada ao AMPc adquire a capacidade de reconhecer uma sequência desoxirribonucleotídica de uma parte do promotor permitindo a iniciação da transcrição. O AMPc juntamente com a proteína receptora parece desempenhar um papel regulador no mecanismo de síntese enzimática em organismos procariontes (57) entretanto em eucariontes como a *Chlorella* sp (42) o sal sódico de AMPc e o dibutiril AMPc não exercem qualquer efeito. O efeito repressor e inativante estimulado pela glucose sobre a síntese da LDHPNI em células em *Dactylium dendroides* em repouso foi analisada na presença de dibutiril AMPc. A acentuada repressão da síntese de LDHPNI estimulada pela glucose (figura 14) é parcialmente revertida na presença de 1 mM de AMPc. Embora o grau de rever

são seja somente de 25%, não se pode deixar de atribuir a este nucleotídeo a capacidade de minimizar o efeito repressor observado. É provável que o emprego de maior concentração de AMPc possa reverter totalmente o efeito repressor provocado pela glucose, uma vez que existe caso de repressão catabólica, cuja reversão só é conseguida com 5 mM de AMPc (57).

A inativação da LDHPNI estimulada pela glucose ( figura 14) é evitada na presença de AMPc. Embora a prevenção não tenha sido total, o efeito do nucleotídeo não deixa de ser significativo. Desde que a repressão da síntese da LDHPNI ocorre simultaneamente com a sua inativação na presença de glucose, não se pode afirmar que o AMPc reverteu especificamente um dos processos envolvidos. Como hipótese de trabalho existem duas possibilidades; a primeira, que nucleotídeo tenha revertido somente a repressão da síntese sem interferir com a inativação e a segunda que ambos os processos teriam sido revertidos, parcialmente. Das possibilidades apresentadas a mais provável é a primeira, uma vez que a reversão da repressão da síntese de enzimas por AMPc é fato constatada em diferentes organismos (55, 56, 57). Entretanto não se pode descartar totalmente a possibilidade do nucleotídeo ter revertido, pelo menos parcialmente o processo de inativação.

Os estudos realizados indicam claramente que a regulação dos níveis de LDHPNI em células de *Dactylium dendroides* se processa fundamentalmente por repressão catabólica e por inativação fisiológica. Entretanto outros estudos deverão ser realizados na tentativa de esclarecer o mecanismo intrínscico destes fenômenos. É de importância capital a comprovação da existência e da participação do proposto fator inativante de natureza proteica no mecanismo de inativação. Igualmente importante será o esclarecimento da participação ou não do AMPc na reversão do processo de inativação.

## CONCLUSÕES

1. Entre as fontes de carbono testadas, somente o lactato de sódio induz a síntese da LDHPNI em células de *Dactylium dendroides* em crescimento ou em repouso.
2. O nível máximo da enzima induzida em células em crescimento não difere daquele obtido com células em repouso.
3. A síntese da enzima é inibida por cicloheximida indicando que seu aparecimento é dependente da síntese de novo.
4. O etanol, glicerol, glucose e piruvato exercem efeito repressor sobre a indução da síntese da LDHPNI.
5. A enzima induzida por lactato em células em crescimento ou em repouso sofre inativação pela adição de glucose ao cultivo.
6. A inativação fisiológica da LDHPNI de *Dactylium dendroides* é um processo reversível; o reaparecimento da atividade enzimática na presença de cicloheximida sugere que o fator proteico inativante sintetizado na presença de glucose possui vida média muito curta.
7. Este tipo de inativação fisiológica é diferente da inativação catabólica.

## 6 - AGRADECIMENTOS

## AGRADECIMENTOS

A minha eterna gratidão

- Ao Dr. SHIGEHIRO FUNAYAMA, orientador desta tese, que com estímulo, dedicação acompanhou todas as fases de desenvolvimento deste trabalho.
- À Dra. GLACI T. ZANCAN, Coordenadora do Curso de Pós - Graduação em Bioquímica da U.F.Pr., pela inestimável ajuda, amizade e constantes incentivos.
- Ao Dr. FÁBIO DE O. PEDROSA, Professor MANOEL F. GUIMARÃES e Professora MARIA BENIGNA MARTINELLI DE OLIVEIRA pela revisão e sugestões do presente trabalho.
- À Dra. DÉA AMARAL por sua confiança e colaboração.
- Ao Dr. LUIZ R. MARECHAL por sua amizade, oportunas sugestões e discussões.
- Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da U.F.Pr. pelo apoio e colaboração.
- Aos colegas de laboratório pela amizade e boa vontade que sempre me dispensaram
- À CAPES e FINEP pelo apoio financeiro durante o período de desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Dr. MILTON GIOVANNONI e Dra. EGLÉ T. BUSETTI pelo meu encaminhamento profissional e pelo apoio sempre prestado.
- A Sra. MARIA HELENA B. IMAYUKI pela revisão das referências bibliográficas.

## 7 - BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, B.G. Induction of galactokinase in *Saccharomyces cerevisiae*. Kinetics of induction and glucose effects. J. Bacteriol., 111:308-315, 1972.
2. BENNETT, P.M. & HOLMS, W.H. Reversible inactivation of the isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli* M L 308 during growth on acetate. J. Gen. Microbiol., 87: 37-51, 1975.
3. BERMAN, N. & RETTGER, L.F. The influence of carbohydrate on the nitrogen metabolism of bacteria. J. Bacteriol., 3: 389-402, 1918.
4. BRABSON, J.S. & SWITZER, R.L. Purification and properties of *Bacillus subtilis* aspartato transcarbamilase. J. Biol. Chem., 250: 8664-8669, 1975.
5. BRITTEN, R.J. & DAVSON, E.H. Gene regulation for higher cells: a theory. Science, 165: 349-357, 1969.
6. BROWN, H.D.; SATYANAYANA, T.; UMBARGER, H.E. Biosynthesis of branched-chain amino-acids in yeast: Effect of carbon source on leucine biosynthetic enzymes. J. Bacteriol., 121: 959-969, 1975.
7. CLARKE, P.H. & HOULDSWORTH, A. Catabolite repression and the induction of amidase synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* 8602 in continuous culture. J. Gen. Microbiol., 51:225-234, 1968.
8. CIRIAY, M. Cis-dominant regulatory mutations affecting the formation of glucose -repressible alcohol dehydrogenase (ADH) in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet., 145:327-333, 1976.
9. DINIERT, F. Sur la fermentation du galactose et sur l'acromutance des levures a ce sucre. Ann. Inst. Pasteur. Paris, 14:139-189, 1900.
10. DICKSON, C.R. & MARKIN, J.S. Physiological studies of  $\beta$ -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. J. Bacteriol., 142: 777-785, 1980.

11. DUNTZE, W.; NEWMANN, D.; HOLZER, H. Glucose induced inactivation of malate dehydrogenase in intact yeast cells. Eur. J. Biochem., 3:326-331, 1968.
12. EPPS, H.M.R. & GALE, E.F. The influence of the presence of glucose during growth on the enzymatic activities of *Escherichia coli* comparison of the effects with that produced by fermentation acids. Biochem. J., 39: 619-632, 1942.
13. FELDMAN, D.A. & DATTA, P. Catabolite inactivation of biodegradative threonine dehydratase of *Escherichia coli*. Biochem., 14:1760-1767, 1975.
14. FERGUSON, J.; BOLL, M.; HOLZER, H. Yeast malate dehydrogenase and enzyme inactivation in catabolite repression. Eur. J. Biochem., 1:21-25, 1967.
15. FRIEBE, B. & HOLLDORF, A.W. Control of extracellular  $\beta$ -1,3-glucanase activity in a basidiomycete species. J. Bacteriol., 122: 818-825, 1975.
16. FUNAYAMA, S. Síntese e degradação de frutose-1,6- difosfatase de *Saccharomyces cerevisiae*, Tese de Doutorado, Curitiba, Pr., 1979. 78 pag. mimeografadas.
17. FUNAYAMA, S.; GANCEDO, J.M.; GANCEDO, C. Turnover of yeast fructose -1,6-bisphosphatase in different metabolic condition. Eur. J. Biochem., 109:61-65, 1980.
18. FUNAYAMA, S. & ZANCAN, G.T. Purification and properties of pyridine nucleotide-independent L-lactate dehydrogenase from *Polyporus circinatus*. J. Bacteriol., 119:1000-1005, 1974
19. GALE, E.F. Factors influencing the enzymic activities of bacteria. Bacteriol. Rev., 7:139-173, 1943.
20. GANCEDO, C. Inactivation of fructose-1,6-diphosphatase by glucose in yeast. J. Bacteriol., 107:401-405, 1971.
21. GANCEDO, C. & SCHWERZMANN, K. Inactivation by glucose of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol., 109:221-225, 1976.

22. GASGÓN, S.; NEUMANN, N.P.; LAMPEN, O.J. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases of yeast. J. Biol. Chem., 243:1573-1577, 1968.
23. GIFFHORN, F. & GOTTSCHALK, G. Effect of growth on the activation and inactivation of citrate lyase of *Rhodospseudomonas gelatinosa*. J. Bacteriol., 124: 1046-1051, 1975.
24. GIFFHORN, F. & GOTTSCHALK, G. Inactivation of citrate lyase from *Rhodospseudomonas gelatinosa* by a specific deacetylase and inhibition of this inactivation by L-(+)-glutamate. J. Bacteriol., 124: 1052-1061, 1975.
25. GORTZ, C.P.M. Effects of glucose on the activity and the kinetics of the maltose uptake system and of  $\alpha$ -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys Acta, 184:299-305, 1969.
26. HANSEN, R.J.; SWITZER, R.L.; HINZE, H.; HOLZER, H. Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases and proteinase inhibitors in yeast. Biochim. Biophys. Acta, 496:103-114, 1977.
27. HARRIS, W. & FERGUSON, J.J.Jr. Inactivation of yeast fructose-1,6-diphosphatase in the course of catabolite repression. Fed. Proc., 26: 678, 1967.
28. HEMMINGS, B.A. Evidence for the degradation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase of *Candida utilis* during rapid enzyme inactivation. J. Bacteriol., 133:867-877, 1978.
29. HOLZER, H. Catabolite inactivation in yeast. Trends Biochem. Sci., 1:178-181, 1976.
30. HOLZER, H. & DUNTZE, W. Metabolic regulation by chemical modification of enzymes. Ann. Rev. Biochem., 40:345-373, 1971.
31. JACOB, F. & MONOD, J. Genetic regulatory mechanism in the induced synthesis of proteins. J. Mol. Biol., 3:318-356, 1961.

32. JAYARAMAN, J.; COTMAN, C.; MAHLER, H.R.; SHARP, C.V. Biochemical correlation of respiratory deficiency VII. Glucose repression. Arch. Biochem. Biophys., 106:224-251, 1966.
33. LAWThER, R.P. & COPPER, T.G. Kinetics of induced and repressed enzyme synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol., 121:1064-1073, 1975.
34. LORIMER, G.H.; GEWITZ, H.S.; VOLKER, W.; SOLOMONSON, L.P.; VENNESLAND, B. The presence of bound cyanide in the naturally inactivated form of nitrate reductase of *Chlorella vulgaris*. J. Biol. Chem., 249:6074-6079, 1974.
35. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A. ; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
36. KATZ, J. & WISS, Jb. 31:599. In Advances Physiol. ed. (A.H. Rose and J.F. Wilkson) vol. 4 Academic press. London and New York. 1970. pp 251-318, 1898.
37. KEPES, A. Kinetics of induced enzyme synthesis. Determination of the mean life of galactosidase-specific messenger RNA. Biochem. Biophys. Acta, 76:293-309, 1963.
38. MAGASANIK, B. Catabolite repression. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26:249-256, 1961.
39. MAGASANIK, B. Glucose effects: inducer exclusion and repression. In ZISPER, D. & BECKWITH, ... ed, The Lac Operon. New York Cold Spring Harbor Laboratory, p. 189-219, 1970.
40. MANDELSTAM, J. Induced biosynthesis of lysine decarboxylase in *Bacterium cadaveris*. J. Gen. Microbiol., 11:426-437, 1954.
41. MARKUS, Z.; MILLER, G.; AVIGAD, G. Effect of culture conditions on the production of D-galactose oxidase by *Dactylium dendroides*. Appl. Microbiol., 13:686-693, 1965.
42. McCULLOUGH, W. & JOHN, P.C.L. Control of D novo isocitrate lyase synthase in *Chlorella*. Nature, 239:402-405, 1972.

43. MONOD, J. The phenomenon of specific adaptation. Growth, 11 : 223-289, 1947.
44. MONOD, J. The growth of bacterial cultures. Ann. Rev. Microbiol., 3:371-394, 1949.
45. MOSES, V. & PREVOST, C. Catabolite repression of  $\beta$ -galactosidase synthesis in *Escherichia coli*. Biochem. J., 100: 336-353, 1966.
46. NAKADA, D. & MAGASANIK, B. Catabolite repression and the induction of  $\beta$ -galactosidase. Biochim. Biophys. Acta, 61:835 - 837, 1962.
47. NAKADA, D. & MAGASANIK, B. The roles of inducer and catabolite repressor in the synthesis of  $\beta$ -galactosidase by *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., 8:105-127, 1964.
48. NEEFF, J.; HAGELE, E.; NAUHAUS, J.; HEER, U.; MECKE, D. Evidence for catabolite degradation in the glucose dependent inactivation of yeast cytoplasmic malate dehydrogenase. Eur. J. Biochem., 87:489-495, 1978.
49. NEEFF, J.; HAGELE, E.; NAUHAUS, J.; HEER, U.; MECKE, D. Application of an immunoassay to the study of yeast malate dehydrogenase inactivation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 80: 276-282, 1978.
50. NYGAARD, A.P. Lactate dehydrogenase of yeast. p. 557-565. In P.D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrback (ed), The enzymes, vol. 7. Academic Press Inc. New York, 1963.
51. OLIVEIRA, B.M.M. & ZANCAN, G.T. Effect of glucose on  $\alpha$ -glucan degradation in *Polyporus circinatus*. J. Bacteriol., 145: 171-174, 1981.
52. ORTIZ, J.M.; BERKELEY, R.C.W.; BREWER, J.S. Production of an exo- $\beta$ -N-acetyl-glucosaminidase by *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol., 77:331-337, 1973.
53. PAIGEN, K. Phenomenon of transient repression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 91:1201-1209, 1966.

54. PAIGEN, K. & WILLIAMS, B. Catabolite repression and other control mechanism in the carbohydrate utilization. Adv. Microb. Physiol., 4:251-324, 1970.
55. PASTAN, I. & ADHYA, S. Cyclic adenosine-5-monophosphate in *Escherichia coli*. Bacteriol. Rev., 40:527-551, 1976.
56. PASTAN, I. & PERLMAN, R.L. The role of the lac promoter locus in regulation of  $\beta$ -galactosidase synthesis by cyclic 3'-5'-A adenosine monophosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 61:1336 - 1342, 1968.
57. PERLMAN, R.L.; CROMBRUGGHE, D.B.; PASTAN, I. Cyclic AMP regulates catabolite and transient repression in *Escherichia coli*. Nature, 223:810-812, 1969.
58. PRITCHARD, G.G. An NAD<sup>+</sup>-independent L-lactate dehydrogenase from *Rhizopus oryzae*. Biochim. Biophys. Acta, 250: 25-30, 1971.
59. ROBERTSON, J.J. & HALVORSON, H.O. The components of maltozymase in yeast and their behavior during deadaptation. J. Bacteriol., 73:196-198, 1957.
60. SAHEKI, T. & HOLZER, H. Comparisons of the tryptophan syntase inactivating enzymes with proteinases from yeast. Eur. J. Biochem., 42:621-626, 1974.
61. SAHEKI, T. & HOLZER, H. Proteolytic activities in yeast. Biochim. Biophys. Acta, 384:203-214, 1975.
62. SIEGEL, M.R. & SISLER, H.D. Site of action of cicloheximida in cells of *Saccharomyces pastorianus*. I. Effect of the antibiotic on cellular metabolism. Biochim. Biophys. Acta, 87: 70-82, 1964.
63. SNOSWEEL, A.M. Stereospecific DNP-independent lactic dehydrogenase of *Lactobacillus arabinosus* 17.5. Biochem. Biophys. Acta, 35:574-475, 1959.
64. SNOSWEEL, A.M. Oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide independent lactate dehydrogenases of *Lactobacillus arabinosus* 17.5. Biochim. Biophys. Acta., 77:7-9, 1963.

65. SORGER, J.G.; DEBANNE, T.M. and DAVIES, J. Effect of nitrate on the synthesis and decay of nitrate reductase of *Neurospora*. Biochem. J., 140:395-403, 1974.
66. STADTMAN, E.R. & GINSBURG, A. The glutamine synthetase of *Escherichia coli*: Structure and control. In BOYER, P.D. The enzymes, 3 ed. New York, Academic, 1974. v. 10, p. 755-807.
67. SWITZER, R.L. The inactivation of microbial enzymes in vivo. Ann. Rev. Microbiol., 31:135-157, 1977.
68. SYPHERED, P.S. & STRAUSS, N. Chloramphenicol-promoted repression of  $\beta$ -galactosidase synthesis in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 49:400-407, 1963.
69. TOMÁS, S.; VILLANUEVA, J.R.; NOMBELA, C. Regulation of  $\beta$ -1,3 glucanase synthesis in *Penicillium italicum*. J. Bacteriol., 133:542-548, 1978.
70. TOMKINS, G.M.; GELEHRTER, T.D.; GRANNER, D.; MARTIN, D.Jr., SAMUELS, H.; THOMPSON, E.B. Control of specific gene expression in higher organisms. Science, 166:1474-1480, 1969.
71. TYLER, B.; LOOMIS, W.F.; MAGASANIK, B. Transient repression of the lac operon. J. Bacteriol., 94:2001-2011, 1967.
72. WALKER, H. & EAGON, R.G. Lactic dehydrogenases of *Pseudomonas natriegens*. J. Bacteriol., 88:25-30, 1964.
73. WAYNE, B.A.; SCHNEIDER, A.B.; EMMER, M.; PERLMAN, L.R.; PASTAN, I. Purification of and properties of the cyclic adenosine 3'5' monophosphate receptor protein which mediates cyclic adenosine 3'-5' monophosphate dependent gene transcription in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 246:5929-5937, 1971.
74. WIELAND, O. & JAGOW-WEATHERMANN, B. ATP-Dependent inactivation of heart muscle pyruvate dehydrogenase and reactivation by  $Mg^{++}$ . Febs. Lett., 3:271-274, 1969.
75. WIJK, R. van. Proc. K. Ned. Akad. Wet., 71:302, 1968. Cited by PAIGEN, K. & WILLIAMS, B. Catabolite repression and other control mechanism in the carbohydrate utilization. Adv.

- Microb. Physiol., 4:251-324, 1970.
76. WIJK, R. van; OUWEHAND, J.; van DEN BOS, T.; KONINGSBERGER, V. V. Induction and catabolite repression of  $\alpha$ -glucosidase synthesis in protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis*. Biochim. Biophys. Acta, 186:178-191, 1969.
77. WILLIAMS, L.S. & NEIDHARDT, F.C. Synthesis and inactivation of Aminoacyl-transfer RNA synthetases during growth of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., 43:529-550, 1969.
78. WISEMAN, A. Enzyme induction in microbiol organism. In PARKE, D.V. Enzyme induction. London, Plenum, 1975. p. 1-26.
79. WITT, I.; KRONAU, R.; HOLZER, H. Isoenzyme der Malat dehydrogenase und ihre regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta, 128:63-73, 1966.
80. WOODS, D.D. The action of washed suspensions of *Bacterium coli* on indole derivates. Biochem. J., 29:649-655, 1935.
81. YAMADA, K.; YAMADA, H.; TAKASUE, Y.; TANAKA, S. The presence of two lactic dehydrogenases in *Pericularia oryzae*. J. Biochem., 50:72-73, 1961.